



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VINÍCIUS DANTAS DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DA
CASCA DE *Citrus sinensis* SOBRE A COMPETÊNCIA MEIÓTICA DE OÓCITOS
SUÍNOS**

MOSSORÓ-RN

2024

VINÍCIUS DANTAS DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DA
CASCA DE *Citrus sinensis* SOBRE A COMPETÊNCIA MEIÓTICA DE OÓCITOS
SUÍNOS**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) como requisito para obtenção do título em Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira.

**MOSSORÓ–RN
2024**

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

S586i Silva , Vinicius Dantas da.
Investigação do potencial antioxidante do óleo
essencial da casca de Citrus sinensis sobre a
competência meiótica de oócitos suínos / Vinicius
Dantas da Silva . - 2024.
58 f. : il.

Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de --Selecione um
Curso ou Programa--, 2024.

1. Compostos naturais. 2. Produção de embriões.
3. Maturação oocitária. 4. Estresse oxidativo. I.
Pereira, Alexsandra Fernandes, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

VINÍCIUS DANTAS DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DA
CASCA DE *Citrus sinensis* SOBRE A COMPETÊNCIA MEIÓTICA DE OÓCITOS
SUÍNOS**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) como
requisito para obtenção do título em Bacharel
em Biotecnologia.

Data de defesa: 12 / 09 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira
Presidente e Orientadora

Mestre em Ciência Animal Leonardo Vitorino Costa de Aquino
Membro Examinador

Doutora em Ciência Animal Maria Valeria de Oliveira Santos
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha mais profunda gratidão à minha mãe, Valdeci Maciel Dantas, por tudo que você fez por mim. Seu incansável esforço e incentivo foram a base para a minha educação e carreira acadêmica. Você sempre acreditou em mim, mesmo quando eu duvidava de mim mesmo. Você me ensinou a importância da educação e me incentivou a seguir os meus sonhos. Sua dedicação e sacrifício permitiram que eu tivesse as oportunidades que tenho hoje. Seu amor e apoio incondicionais foram a força motriz por trás do meu sucesso. Você me ensinou a ser resiliente, a trabalhar duro e a nunca desistir. Você me mostrou que com determinação e esforço, posso alcançar qualquer coisa que eu me proponha a fazer. Mãe, obrigada por ser minha maior defensora, minha mentora e minha amiga. Sua influência moldou quem eu sou hoje e por isso, serei eternamente grato.

Aos meus familiares, agradeço profundamente pelo apoio e incentivo constantes. A presença e a generosidade de meus avós, tios, tias e irmãos foram fundamentais na minha jornada. Vocês me ensinaram o valor da família e da união. Sou grato por fazerem parte da minha história.

Aos meus amigos, o carinho, apoio e empatia que vocês demonstraram por mim ao longo dos anos têm sido inestimáveis. Vocês estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins, sempre prontos para me oferecer uma palavra de conforto ou um ombro amigo. Os momentos de descontração que compartilhamos juntos são algumas das minhas memórias mais preciosas. Seja rindo juntos, compartilhando histórias ou simplesmente desfrutando da companhia um do outro, esses momentos me ajudaram a relaxar e a recarregar as energias. Vocês fortaleceram um laço que vai além da amizade. Vocês me fizeram sentir acolhido e amado, e por isso, sou eternamente grato. Agradeço a todos vocês por fazerem parte da minha vida.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA), pelo auxílio nos experimentos. Em especial, ao meu coorientador, Leonardo Vitorino Costa de Aquino, pela paciência que não foi pouca e pelo auxílio para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira, por ser uma professora incrível, por sua compreensão e por acreditar em mim. Agradeço pelos conselhos, a sua paciência e por todos os incentivos e cobranças.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), a entidade que possibilitou tudo isso, e ao empenhado conjunto de docentes do curso de Biotecnologia, manifesto minha sincera gratidão.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte/Apodi (IFRN, responsáveis: Profa. Dra. Luciana Medeiros Bertini e Prof. Dr. Tassio Lessa do Nascimento) por permitir a obtenção e análise química do óleo essencial da casca de laranja.

Ao Abatedouro e Frigorífico Industrial de Mossoró S/A (AFIM) por disponibilizar o material biológico para realização deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora por buscarem contribuir da melhor maneira com o trabalho.

Finalmente, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Iniciação Científica por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI/CNPq).

*“Então serra os punhos e sorria e
jamais volte pra sua quebrada de
mão e mente vazia”*

Emicida

RESUMO

Os antioxidantes obtidos a partir de fontes naturais, como os óleos essenciais, são uma das alternativas para a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos suínos, quando comparados aos antioxidantes sintéticos, como a cisteamina, visto que estudos têm demonstrado a eficiência dos óleos essenciais na melhoria das taxas de MIV, bem como na redução das espécies reativas de oxigênio (EROs). Nesse sentido, o óleo essencial extraído da casca de *Citrus sinensis* pode ser utilizado na maturação *in vitro* de oócitos suínos devido à sua ação antioxidante comprovada em concentrações de 10 a 50 µg/mL. Portanto, considerando a eficiência antioxidante do óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* (OECS), o estudo objetivou avaliar o seu efeito sobre a MIV de oócitos suínos, como alternativa ao antioxidante sintético. Para tanto, oócitos suínos provenientes de ovários de abatedouro local foram recuperados e submetidos à MIV. **Dois etapas** foram realizadas neste estudo. A **primeira etapa** teve como objetivo determinar a melhor concentração de OECS em associação a cisteamina a partir da seguinte comparação: i) Controle (cisteamina: 100 µM); ii) Cisteamina + 10 µg/mL de OECS (CIS+OECS10); iii) Cisteamina + 30 µg/mL de OECS (CIS+OECS30); iv) Cisteamina + 50 µg/mL de OECS (CIS+OECS50). Após a MIV, oócitos foram avaliados quanto à expansão e viabilidade das células do *cumulus*, maturação nuclear (primeiro corpúsculo polar [1CP] e metáfase II) e citoplasmática, padrão mitocondrial, níveis de EROs e atividade bioenergética ($\Delta\Psi_m$). Na **segunda etapa** a melhor concentração obtida anteriormente do OECS, foi avaliada quanto a sua ação antioxidante em função do seu efeito sinérgico ou substituível à cisteamina, considerando os grupos: i) Cisteamina (100 µM) (CIS); ii) Cisteamina + melhor concentração do OECS (CIS+OECS); iii) melhor concentração do OECS (OECS). Após a MIV, oócitos foram avaliados quanto à expansão e viabilidade das células do *cumulus*, 1CP e níveis de EROs. Todos os oócitos foram maturados por 44 h sob temperatura e atmosfera modificada (38,5 °C; 6,5% CO₂). Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de dez (primeira etapa) e três (segunda etapa) repetições. Dados em percentuais foram comparados pelo teste do qui-quadrado, enquanto os demais valores foram transformados em arco-seno e avaliados por ANOVA e teste de Tukey. Na **primeira etapa**, 861 oócitos imaturos e viáveis foram selecionados a partir de 282 ovários (3,05 oócito/ovário) e submetidos à MIV. A taxa de expansão das células do *cumulus* foi maior em CIS+OECS10 (70,8 $\pm$ 4,4) em comparação com CIS+OECS50 (57,1 $\pm$ 5,4), mas ambos foram semelhantes a CIS+OECS30 e ao controle ($P < 0,05$). Além disso, o grupo CIS+OECS50 (90,3% $\pm$ 2,3) foi superior ao OECS10 (88,0% $\pm$ 2,6), OECS30 (87,6% $\pm$ 2,9) e controle (75,1% $\pm$ 4,9) após análise da viabilidade das células do *cumulus*. Nenhuma diferença foi observada após a análise do 1CP, metáfase II e maturação citoplasmática ($P > 0,05$). Contudo, CIS+OECS50 (85,7% $\pm$ 11,1) foi superior ao controle (63,0% $\pm$ 3,03) após a avaliação do padrão mitocondrial. Quanto aos níveis de EROs, CIS+OECS50 (0,62 $\pm$ 0,17) resultou num menor nível quando comparado ao controle (1,00 $\pm$ 0,44) e OECS10 (1,03 $\pm$ 0,45), embora a $\Delta\Psi_m$ não tenha diferido entre os grupos. Portanto, considerando que o CIS+OECS50 foi avaliado como o melhor grupo, na **segunda etapa** foram utilizados 141 oócitos imaturos e viáveis a partir de 54 ovários (2,6 oócito/ovário). Quanto à expansão das células do *cumulus*, nenhuma diferença foi observada entre os grupos, embora o OECS50 (92,4% $\pm$ 0,6) tenha resultado numa melhor viabilidade das células do *cumulus* comparado ao CIS (88,4% $\pm$ 1,1) e CIS+OECS50 (81,7% $\pm$ 3,1). Quanto ao 1CP e níveis de EROs, nenhuma diferença foi observada ($P > 0,05$). Diante disso, pôde-se concluir que o OECS na concentração de 50 µg/mL pode ser utilizado como um agente substituto a cisteamina, uma vez que melhorou parâmetros relacionados à maturação e fisiologia de oócitos suínos.

Palavras-chave: Compostos naturais, produção de embriões, maturação oocitária, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Antioxidants obtained from natural sources, such as essential oils, are one of the alternative proposals for the *in vitro* maturation (IVM) of porcine oocytes, when compared to synthetic antioxidants, such as cysteamine, as studies have demonstrated the efficiency of the oils essential in improving MIV rates, as well as reducing reactive oxygen species (ROS). In this context, the essential oil extracted from *Citrus sinensis* peel can be used in IVM of porcine oocytes due to its proven antioxidant activity at concentrations of 10 to 50 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, considering the antioxidant efficiency of *Citrus sinensis* peel essential oil (EOCS), the study aimed to evaluate its effect on the IVM of porcine oocytes, as an alternative to synthetic antioxidants. For this purpose, porcine oocytes from ovaries from a local slaughterhouse were recovered and subjected to IVM. **Two stages** were carried out in this study. The **first stage** aimed to determine the best concentration of OECS in association with cysteamine based on the following comparison: i) Control (cysteamine: 100 μM); ii) Cysteamine + 10 $\mu\text{g/mL}$ EOCS (CYS+EOCS10); iii) Cysteamine + 30 $\mu\text{g/mL}$ EOCS (CYS+EOCS30); iv) Cysteamine + 50 $\mu\text{g/mL}$ OECS (CYS+EOCS50). After IVM, oocytes were evaluated for *cumulus* cell expansion and viability, nuclear (first polar body [1CP] and metaphase II) and cytoplasmic maturation, mitochondrial pattern, ROS levels and bioenergetic activity ($\Delta\Psi\text{m}$). In the **second stage**, the best previously obtained concentration of EOCS was evaluated for its antioxidant action based on its synergistic or substitutable effect on cysteamine, considering the groups: i) Cysteamine (100 μM) (CIS); ii) Cysteamine + best EOCS concentration (CIS+ EOCS); iii) better concentration of EOCS (EOCS). After IVM, oocytes were evaluated for cumulus cell expansion and viability, 1CP and ROS levels. All oocytes were matured for 44 h under modified temperature and atmosphere (38.5 $^{\circ}\text{C}$; 6.5% CO_2). All results were expressed as mean $\pm$ standard error of ten (**first stage**) and three (**second stage**) repetitions. Data in percentages were compared using the chi-square test, while other values were transformed into arcsine and evaluated using ANOVA and the Tukey test. In the first stage, 861 immature and viable oocytes were selected from 282 ovaries (3.05 oocyte/ovary) and subjected to IVM. *Cumulus* cell expansion was higher in CYS+EOCS10 (70.8 ± 4.4) compared to CYS+EOCS50 (57.1 ± 5.4), but both were similar to CYS+EOCS30 and the control ($P < 0.05$). Furthermore, the CYS+EOCS50 group ($90.3\% \pm 2.3$) was superior to the CYS+EOCS10 ($88.0\% \pm 2.6$), CYS+EOCS30 ($87.6\% \pm 2.9$) and control ($75.1\% \pm 4.9$) after analyzing the viability of *cumulus* cells. No difference was observed after analyzing 1PB, metaphase II and cytoplasmic maturation ($P > 0.05$). However, CYS+EOCS50 ($85.7\% \pm 11.1$) was higher than the control ($63.0\% \pm 3.03$) after evaluating the mitochondrial pattern. Regarding ROS levels, CYS+EOCS50 (0.62 ± 0.17) resulted in a lower level when compared to the control (1.00 ± 0.44) and CYS+EOCS10 (1.03 ± 0.45), although $\Delta\Psi\text{m}$ did not differed between groups. Therefore, considering that CYS+EOCS50 was evaluated as the best group, in the second stage, 141 immature and viable oocytes were used from 54 ovaries (2.6 oocyte/ovary). Regarding *cumulus* cell expansion, no difference was observed between groups, although EOCS50 ($92.4\% \pm 0.6$) resulted in better *cumulus* cell viability compared to CYS ($88.4\% \pm 1.1$) and CYS+EOCS50 ($81.7\% \pm 3.1$). Regarding 1PB and ROS levels, no difference was observed ($P > 0.05$). Therefore, it was concluded that EOCS at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ can be used as a substitute for cysteamine, as it improved parameters related to the maturation and physiology of porcine oocytes.

Keywords: Natural compounds, embryo production, oocyte maturation, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores intrínsecos e extrínsecos que provocam o surgimento de EROs, e ocasionam estresse oxidativo durante a MIV de oócitos suínos. Fonte: Própria autoria. 21

Figura 2. Desenho experimental da avaliação da maturação nuclear, citoplasmática e fisiológica de oócitos suínos após a MIV. Fonte: Autoria própria..... 30

Figura 3. Representação dos estágios de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos suínos suplementados com CIS+OECS50 após 44 horas de MIV. **(a)** Extrusão do primeiro corpo polar (1PB). **(b)** Oócito suíno corado com Hoechst 33342. **(c)** Oócito suíno com mitocôndrias dispersas por todo o citoplasma, exibindo padrões de agregação mitocondrial do tipo B. **(d)** Oócitos suínos com mitocôndrias em transição por todo o citoplasma, exibindo padrões de agregação mitocondrial do tipo A. Barra de escala: 50 μ m, ampliação 20 $\times$ **(a, b)**; 100 μ m, ampliação 40 $\times$ **(c, d)**..... 37

Figura 4. Padrão mitocondrial de oócitos suínos cultivados em meio suplementado com OECS **(a)** Taxa de distribuição mitocondrial e **(b)** Padrão de agregação mitocondrial. ^{a,b}; Valores com diferentes letras sobrescritas em colunas são significativamente diferentes ($p < 0,05$). 38

Figura 5. Avaliação dos níveis de ROS intracelulares e $\Delta\Psi_m$ em oócitos suínos suplementados com antioxidantes após 44 horas de MIV. **(a-d)** Representação de oócitos suínos após coloração com a sonda fluorescente H₂DCFDA. **(e)** Quantificação de unidades arbitrárias de fluorescência de EROs após MIV de oócitos suínos com diferentes suplementos. **(f-i)** Representação de oócitos suínos após coloração com a sonda fluorescente MitoTracker Red® (CMXRos). **(j)** Quantificação de unidades arbitrárias de fluorescência de $\Delta\Psi_m$ após MIV de oócitos suínos com diferentes suplementos. Barra de escala: 50 μ m, ampliação 20 $\times$ (a, b, c, d, f, g, h, i). ^{a,b}; Valores com diferentes letras sobrescritas em colunas são significativamente diferentes ($p < 0,05$). 39

Figura 6. Representação de oócitos suínos após 44 h de MIV suplementado com cisteamina, OECS50 ou uma combinação desses antioxidantes. (a-a') 100 μ M de cisteamina (CIS). (b-b') Concentração de OECS50 com CIS (CIS+OECS50). (c-c') Concentração de OECS50

(OECS50). Barra de escala: 50 μm , ampliação 10 $\times$ (a-a', b-b', c-c')..... 41

Figura 7. Avaliação dos níveis de EROs intracelulares após 44 horas de MIV de oócitos suínos. **(a-c)** Representação de oócitos suínos corados com a sonda fluorescente H₂DCFDA sob diferentes suplementos. **(d)** Quantificação de unidades arbitrárias de fluorescência de EROs após MIV de oócitos suínos com diferentes suplementos antioxidantes. Barra de escala: 50 μm , ampliação 20 $\times$ (a, b, c). ($p > 0,05$). 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de <i>C. sinensis</i> (OECS).....	32
Tabela 2. Potencial antioxidante de diferentes concentrações do OECS durante a MIV de oócitos suínos e sua influência sobre as células do <i>cumulus</i> e na maturação nuclear.....	36
Tabela 3. Potencial antioxidante do OECS durante a MIV de oócitos suínos e sua influência sobre as células do <i>cumulus</i> e na maturação nuclear.	40

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Antioxidantes naturais usados na suplementação de meios MIV de suínos.....	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1CP	Primeiro corpúsculo polar
ABTS	Ensaio 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AFIM	Abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró
ANOVA	Análise de variância
CCs	Células do <i>cumulus</i>
CIS	Cisteamina a 100 μM
CIS+OECS10	Cisteamina a 100 μM + óleo a 10 $\mu\text{g/mL}$
CIS+OECS30	Cisteamina a 100 μM + óleo a 30 $\mu\text{g/mL}$
CIS+OECS50	Cisteamina a 100 μM + óleo a 50 $\mu\text{g/mL}$
CMXRos	MitoTracker Red [®]
EGF	Fator de crescimento epidermal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GC	Cromatografia gasosa
GSH	Glutathione
h	Hora
H2DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
ICSI	Injeção citoplasmática de espermatozoide
IFRN	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
L	Litro
LBA	Laboratório de Biotecnologia Animal
mg	Miligrama
MII	Metáfase II
min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
MS	Espectrometria de massa
MSO	Meio de seleção oocitária
NAC	N-acetil-cisteína
NaCl	Cloreto de sódio
OECS	Óleo essencial da casca de <i>Citrus sinensis</i>

OESA	Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
ROO•	Peróxido
SFB	Soro fetal bovino
SFS	Fluido folicular suíno
TCM199	Meio de cultura de tecidos 199

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
+	Soma
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
CO ₂	Dióxido de carbono
ΔΨM	Potencial de membrana mitocondrial
P	Valor-P
O ₂ ⁻	Superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Princípios e limitações da PIVE em suínos	20
2.2 Estresse oxidativo e seus efeitos na MIV de oócitos suínos	20
2.3 Suplementações sintéticas para o controle do estresse oxidativo em oócitos suínos ..	22
2.4 Suplementações naturais no controle do estresse oxidativo em oócitos suínos	23
2.5 Propriedades bioquímicas e biológicas do OECS	24
4 JUSTIFICATIVA.....	28
5.1 Objetivo geral	29
5.2 Objetivos específicos	29
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
6.1 Bioética e locais de execução	30
6.2 Desenho experimental	30
6.3 Extração e análise química do OECS.....	31
6.4 Recuperação dos ovários e seleção dos oócitos	32
6.5 MIV dos oócitos suínos	33
6.6 Avaliação dos oócitos suínos após a MIV.....	33
6.6.1 Avaliação das células do cumulus	33
6.6.2 Análise do corpúsculo polar e estágio nuclear	33
6.6.3 Análise da maturação citoplasmática	34
6.7 Avaliação da atividade antioxidante do OECS.....	34
6.7.1 Avaliação da quantificação dos níveis de EROs.....	34
6.7.2 Análise do potencial de membrana mitocondrial	34
6.8 Análise estatística	35
7 RESULTADOS.....	36
7.1 Seleção da concentração de OECS durante a MIV de oócitos suínos	36
7.1.1 Avaliação de diferentes concentrações do OECS sobre a expansão e viabilidade de células do cumulus, maturação nuclear e citoplasmática	36
7.1.2 Avaliação dos níveis de EROs e atividade bioenergética ($\Delta\Psi_m$) de oócitos suínos.....	38
7.2 Efeito sinérgico ou substituível do OECS50 durante a MIV de oócitos suínos	40
7.2.1 Avaliação do OECS50 sobre a expansão e viabilidade das células do cumulus, primeiro corpúsculo polar de oócitos suínos e níveis de EROs.....	40
8 DISCUSSÃO	43
9 CONCLUSÃO	46
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o modelo suíno tem apresentado um crescente valor biotecnológico agregado não somente a seu status produtivo da suinocultura, mas também para fins de pesquisas básicas, aplicadas e biomédicas (CHEN et al., 2021). Devido às suas semelhanças anatômicas e fisiológicas com os humanos, os suínos têm sido uma escolha valiosa para estudos relacionados à xenotransplante, clonagem e engenharia genética (TEPLITZ et al., 2021). Nesse cenário, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) representa uma importante tecnologia aplicada para essas finalidades, tendo a função de maximizar a eficiência reprodutiva destes animais e elucidar os mecanismos relacionados à formação e ao desenvolvimento embrionário (ZENG et al., 2021).

Em geral, a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos é a primeira etapa da PIVE e desempenha um papel crucial. Neste período, oócitos passam por maturação nuclear e citoplasmática que por são responsáveis por sustentar o desenvolvimento embrionário (ROMAR et al., 2019). Contudo, apesar dos avanços na MIV em suínos, o potencial para o desenvolvimento de embriões a partir de oócitos maturados *in vitro* ainda se mantém inferior (20–25%) em comparação com aqueles maturados *in vivo* (MARQUES; ZANELLA, 2021).

Dentre os principais fatores que afetam a MIV em suínos, a composição do meio e condições de cultivo podem fazer com que a competência da qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário sejam reduzidas (LIANG et al., 2018). Durante a MIV dos oócitos suínos, um dos principais desafios a ser enfrentado é o estresse oxidativo, que é o resultado da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs; XIANG et al., 2021), que provocam alterações sobre as membranas biológicas, ao DNA e seus transcritos, possibilitando um aumento no número de oócitos em apoptose celular (KWAK et al., 2012).

Em condições fisiológicas normais, oócitos possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (TORRES-OSORIO et al., 2019). Assim, com o propósito de diminuir ou controlar o estresse oxidativo em sistemas de cultivo *in vitro* de oócitos suínos, o uso de antioxidantes sintéticos é reportado alternativamente para mimetizar o que ocorre naturalmente *in vivo*. Dentre os antioxidantes sintéticos, a *N*-acetil-cisteína, cisteína e a cisteamina são uma das abordagens utilizadas (KOBAYASHI et al., 2006). Contudo, apesar de os antioxidantes sintéticos serem utilizados como suplemento durante a maturação *in vitro* de oócitos suínos, a taxa de eficiência ainda pode ser aprimorada. (RAKHA et al., 2022). Por essa razão, novos compostos, como as substâncias obtidas de fontes naturais são utilizadas e despertam interesse científico (ALTEMIMI et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

Dentre as substâncias naturais empregadas na MIV de oócitos suínos, os óleos essenciais obtidos a partir do metabolismo secundário de raízes, troncos, gravetos, folhas, botões florais e frutos são utilizados (RAMANA et al., 2018), uma vez que a partir de seus componentes fitoquímicos, é possível melhorar a qualidade oocitária, além de reduzir os níveis de EROs, e, consequentemente, o estresse oxidativo (BAPTISTA-SILVA et al., 2020). Relacionado a isto, a ampla disponibilidade de fontes orgânicas somado ao custo para obtê-los, são fatores positivos para a escolha dessas substâncias naturais como suplementos para a MIV (SANTO et al., 2018). Neste cenário, um óleo essencial que pode ser extraído a partir de frutos e podendo ser empregado na MIV de oócitos suínos é o da casca de *Citrus sinensis*.

O *C. sinensis* ou popularmente conhecida como laranjeira, é uma planta nativa da Ásia, e pertence à família Rutaceae. Sua altura pode variar entre 5 e 10 m de altura (BASTO et al., 2014; FAVELA-HERNÁNDEZ et al., 2016), e seu fruto chamado de laranja-doce é característico por ser globoso, oval e anatomicamente dividido entre o endocarpo e o pericarpo, região no qual é constituída por glândulas que são ricas em metabólitos secundários da planta (FAVELA-HERNÁNDEZ et al., 2016). Em virtude da presença de bioativos na casca, essa região da laranja vem sendo utilizada como fonte para a extração do óleo essencial, que pode ser utilizado na produção de sucos, cosméticos e fármacos (FERRONATTO; ROSSI, 2018). Além disso, por meio de ensaios bioguiados, o óleo essencial da casca de *C. sinensis* (OECS) demonstrou ação antioxidante em estudos *in vitro* utilizando macrófagos murinos (ROBERTO et al., 2009). Ainda, em estudos *in vitro*, o OECS teve sua ação antioxidante durante a MIV e desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos (AQUINO et al., 2023).

Portanto, sabendo do potencial antioxidante do OECS sobre a MIV de oócitos bovinos, e que pode ser um substituto alternativo na melhoria da qualidade oocitária devido seu potencial na redução dos níveis de EROs, torna-se interessante agora avaliar esse composto natural sobre a MIV de oócitos suínos visando conhecer os efeitos sobre o status oxidativo durante o desenvolvimento do oócito, bem como avaliar o potencial efeito aditivo ou substitutivo do OECS a antioxidantes sintéticos durante a MIV de oócitos suíno.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Princípios e limitações da PIVE em suínos

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica de reprodução assistida que tem como objetivo aumentar a eficiência reprodutiva, disseminando o potencial genético de animais de interesse, para obtenção do maior número de descendentes em um menor período (MARQUES; ZANELLA, 2021). Esta técnica consiste nas etapas de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos recuperados de folículos ovarianos, fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos maturados com espermatozoides capacitados, e desenvolvimento *in vitro* (DIV) de presumíveis embriões (SANTOS et al., 2018).

Em suínos, a PIVE é utilizada como uma importante ferramenta para o aprimoramento de processos fisiológicos da maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário (MARQUES; ZANELLA, 2021). Além disso, a PIVE pode atuar como modelo na otimização de meios e sistemas de cultivo mais eficazes para desenvolvimento de embriões, servindo ainda como base para outras biotecnologias, tais como xenotransplantes (CHOI et al., 2021), transgênese (LI et al., 2006) e clonagem por transferência nuclear de célula somática (LIANG et al., 2018). Adicionalmente, a PIVE apresenta um grande potencial comercial para suinocultura, elevando o número de embriões obtidos de fêmeas geneticamente superiores, podendo ainda reduzir o intervalo de gestação a partir do aproveitamento de oócitos imaturos provenientes de fêmeas juvenis (GRUPEN, 2014).

Contudo, a PIVE de suínos ainda apresenta algumas limitações que distanciam a aplicação da técnica em escala comercial. Os desafios prevalentes na PIVE de suínos são a maturação citoplasmática insuficiente, alta taxa de fertilização polispérmica, um baixo número de blastocistos viáveis e com número reduzido de células, resultando em baixo desenvolvimento embrionário *in vitro* (ABEYDEERA, 2002; NIEMANN; RATH, 2001). Dentre os principais fatores que podem resultar nessas reduções de taxas envolvidas sobre as etapas da PIVE de suínos, o estresse oxidativo mediado por EROs durante a MIV dos oócitos são uma das limitações.

2.2 Estresse oxidativo e seus efeitos na MIV de oócitos suínos

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio na produção de EROs e uma menor eliminação desses compostos pelo mecanismo de defesa antioxidante nas células (KHAZAEI;

AGHAZ, 2017). As EROs são moléculas reativas derivadas de oxigênio com um ou mais elétrons desemparelhados (SOTO-HERAS; PARAMIO, 2020). Dentre os principais EROs, podem ser observados o radical de íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxidos ($ROO^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; TORRES-OSORIO et al., 2019). Estas moléculas são geradas a partir de reações bioquímicas naturais que ocorrem nas células, em especial durante a respiração celular (GUERIN et al., 2001).

Em baixos níveis, as EROs atuam em diferentes cascatas de sinalização celular, como segundos mensageiros em processos fundamentais para o metabolismo regular das células (BUCCI et al., 2021). Contudo, fatores ligados às condições do cultivo *in vitro*, como composição do meio de cultivo, incidência de luz, tensão de oxigênio, temperatura de incubação, podem elevar ao aumento dos níveis de EROs, ocasionando danos oxidativos por meio de mecanismos de peroxidação lipídica, degradação de proteínas e ácidos nucleicos (AGARWAL et al., 2022), induzindo modificações estruturais e funcionais importantes para o desenvolvimento do oócito (**Figura 1**).

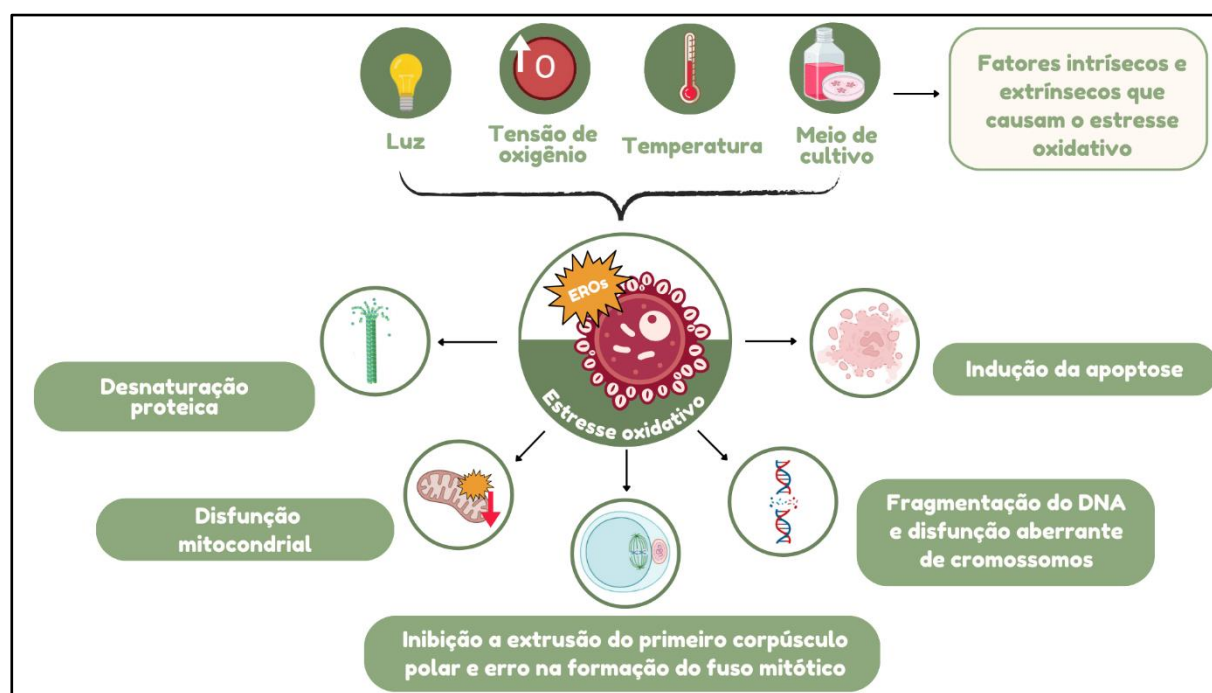


Figura 1. Fatores intrínsecos e extrínsecos que provocam o surgimento de EROs, e ocasionam estresse oxidativo durante a MIV de oócitos suínos. Fonte: Própria autoria.

Wang et al. (2019), avaliando os efeitos do estresse oxidativo ao longo da MIV de oócitos suínos, observaram que uma maior concentração de EROs resultou na redução da taxa

de extrusão do primeiro corpúsculo polar, apontando uma menor taxa de maturação nuclear. Adicionalmente, diferentes estudos já relacionaram o estresse oxidativo à danos nas organelas, como as mitocôndrias, que desempenham papéis cruciais para o desenvolvimento oocitário (WANG et al., 2009; YAO et al., 2019).

Xiang et al. (2021) relataram a redução da atividade de mitocondrial de oócitos suínos associada a altas concentrações de EROs. Além disso, um aumento na taxa de apoptose precoce de oócitos suínos foi observada após o tratamento com H₂O₂ (PAN et al., 2022). Neste mesmo estudo, foi observada uma maior incidência de fusos aberrantes com cromossomos desalinhados, o que afetou negativamente a dinâmica meiótica.

Buscando então reduzir ou controlar o estresse oxidativo provocado pelas EROs, a utilização de substâncias antioxidantes como suplementação os meios de cultivo *in vitro* vem sendo empregados nos estudos biotecnológicos na área de PIVE (RAKHA et al., 2022). Em geral, um agente antioxidante é qualquer composto ou substância que em baixas concentrações, possam reduzir, controlar ou inibir a formação e ação de radicais livres por meio da doação de elétrons, tornando-os estáveis (STAGOS, 2020).

2.3 Suplementações sintéticas para o controle do estresse oxidativo em oócitos suínos

Dentre as classes de antioxidantes utilizados como suplementação nos programas de MIV, compostos sintéticos, como o β -mercaptoetanol, N-Acetil-L-cisteína (NAC), cisteína e cisteamina, auxiliam a manutenção do equilíbrio redox celular (KOBAYASJI et al., 2006; HU et al., 2020; ZHAANG et al., 2022). Esses compostos atuam não apenas na neutralização direta de EROs, mas também estimulam a síntese de antioxidantes endógenos, como a glutathiona (GSH) que compõe a principal linha de defesa antioxidante das células (ZHOU et al., 2019; MATEO-OTERO et al., 2021).

Inicialmente, o β -mercaptoetanol é um composto químico de baixo peso molecular frequentemente utilizado como um inibidor de radicais livres (TAO et al., 2004). Estudos anteriores destacaram que a adição de 12,5 e 25 μ M de β -mercaptoetanol ao meio de MIV de oócitos suínos não apenas aumentou os níveis de GSH, mas também resultou em uma melhora dose-dependente na produção de blastocistos, atingindo valores de 34 e 41%, respectivamente, em comparação com a ausência de adição (26%) (ABEYDEERA, 1998). Além do β -mercaptoetanol, o NAC demonstrou uma ação positiva após a MIV de oócitos suínos, uma vez que promoveu a redução de EROs, bem como auxiliou na expansão das células do *cumulus* (LAI et al., 2015). Adicionalmente, Whitaker et al. (2012) relataram que a adição de NAC ao

meio de MIV e FIV melhorou o desenvolvimento do pró-núcleo masculino e a porcentagem de embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocisto.

Ainda, sobre o uso de suplementos sintéticos, podem se citados a cisteína e cisteamina. Inicialmente, a cisteína é o aminoácido necessário para que ocorra a síntese do GSH (CURRIN et al., 2022). Seu uso como suplemento tem sido essencial durante a MIV de oócitos suínos, pois auxilia no controle de EROs por meio da síntese de GSH (LINH et al., 2008). Além da cisteína, o uso da cisteamina é reportado durante a MIV de oócitos suínos. Isso porque esse composto tem auxiliado significativamente a síntese de GSH por meio da via glutatona. Um exemplo disso é o seu uso na concentração de 100 μ M, que permite uma maior taxa de blastocistos após o emprego da técnica mediada pela injeção intracitoplasmática de espermatozoide (KOBAYASHI et al., 2006; DELEUZE; GOUDET, 2010).

Embora os antioxidantes sintéticos tenham apresentado feitos positivo no controle do estresse oxidativo, a variabilidade presente nos dados obtidos, sugerem que novas alternativas como o uso de antioxidantes naturais podem ser escolhas promissoras durante a PIVE de suínos.

2.4 Suplementações naturais no controle do estresse oxidativo em oócitos suínos

O uso de antioxidante de origem natural em protocolos da MIV vem sendo objeto de estudo de muitos pesquisadores (COSTA et al., 2020). Isso porque essas substâncias são uma alternativa a baixos custos, e que podem proporcionar o controle eficiente do estresse oxidativo. Neste contexto, a crescente busca e identificação de compostos naturais com propriedades antioxidantes é justificada pela sua ampla variedade de distribuição em diferentes plantas (BUDANI; TIBONI, 2020). Além disso, as suplementações naturais podem trazer benefícios a MIV dos oócitos suínos, auxiliando na taxa de maturação nuclear, citoplasmática e desenvolvimento embrionário (NIE et al., 2020; LIU et al., 2023).

Dentre as suplementações naturais empregadas durante a MIV de oócitos suínos, o uso de extratos vegetais tem apresentado bons resultados (WU et al., 2020). Isso ocorre porque esses compostos apresentam em sua composição, uma ampla variedade de moléculas sequestradora de radicais livres, como flavonoides, antocianinas, carotenoides e vitaminas. Nesse sentido, a suplementação do extrato de *Sasa quelpaertensis Nakai* (SQE) promoveu aumento na viabilidade oocitária, na taxa de extrusão do primeiro corpúsculo polar (1CP), e manteve os níveis de antioxidantes intracelulares durante a MIV de oócitos suínos (PYEON et al., 2022). Neste mesmo estudo, a SQE aumentou a taxa de blastocistos e expressão de genes relacionados ao desenvolvimento do blastocisto (NANOG e CDX2), bem como a regulação

positiva de um gene antiapoptótico (BCL2L1) e a modulação de um gene pró-apoptótico (CASP3).

Além de extratos naturais, os óleos essenciais são propostos como antioxidantes naturais. Isso ocorre porque em contraste com os extratos, os óleos essenciais apresentam amostras mais puras de seus bioativos, uma vez que seu processo de extração envolve uma menor interferência de solventes, o que preserva a semelhança com a sua fonte vegetal (EL-MAATI et al., 2016). Dessa forma, o óleo essencial emerge como uma opção atraente para ser utilizado na PIVE, (SANTOS et al., 2019). Um exemplo disso foi o estudo realizado por Santos et al. (2020). Nesse estudo, os autores demonstraram que a concentração de óleo essencial de *Sygyium aromaticum* (OESA; 20 µg/mL) aumentou a expansão das células do *cumulus* e a taxa de maturação oocitária. Além desse estudo, o **Quadro 1** destaca alguns estudos envolvendo o uso de fontes naturais, como suplemento durante a MIV de oócitos suínos visando a redução de EROs, e auxílio na obtenção de blastocistos viáveis e de maior qualidade. Portanto, considerando os benefícios promovidos a partir do uso de fontes naturais durante a MIV de oócitos suínos, uma fonte natural que tem recebido uma atenção científica é o óleo essencial obtido a partir da casca de *Citrus sinensis*.

2.5 Propriedades bioquímicas e biológicas do OECS

O OECS é um substancia extraída da casca da laranja, que apresenta aplicabilidade comercial em diferentes setores como cosméticos e alimentício (LIN et al., 2010; LI et al., 2021; YANG et al., 2023). Além disso, o OECS vem despertando interesse científico ao apresentar diversas propriedades bioativas, como atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (GERACI et al., 2017; SHARMA; TRIPATHI, 2008; FARAHMANDFAR et al., 2020).

Em estudos anteriores, o OECS já exibiu características antioxidantes validadas por testes bioquímicos. Conforme descrito por Ferronato e Rossi (2018), OECS bloqueou 81,4% de radicais livres no teste 1,1-difenil-2-picrihidrazil (método DPPH) e 94,6% de radicais livres no teste 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico ou método ABTS), demonstrando ser um antioxidante eficiente. Além disso, a atividade antioxidante do OECS foi observada por Lin et al. (2021), promovendo a eliminação de radicais livres nos métodos DPPH e ABTS de maneira dose-dependente, respectivamente, de 29,7 e 4,2 mg/mL.

Para além os estudos bioquímicos, Toscano-Garibay et al. (2017) observaram que o OECS reduziu a apoptose tardia (de 70 para 22%) e a geração de radical superóxido em

linhagem células HaCat estimuladas com H₂O₂. Ainda, o OECS tem se destacado com uma ferramenta promissora em biotécnicas de reprodução animal, demonstrando propriedades antioxidantes que apoiam o desenvolvimento de gametas e auxiliam na melhor qualidade de embriões. Isso foi observado por Aquino et al. (2023) onde o estudo avaliou os efeitos antioxidantes do OECS (10, 30 e 50 µg/mL) em oócitos bovinos. Nesse estudo, o OECS na concentração de 10 µg/mL, melhorou a viabilidade dos oócitos e permitiu maior expansão das células do *cumulus*. Além disso, OECS reduziu os níveis de EROs e melhorou a qualidade embrionária, sugerindo que o OECS pode ser um substituto para compostos sintéticos em oócitos bovinos.

Contudo, é fundamental destacar que a resposta a concentrações de OECS pode ser espécie-dependente, considerando que as características fisiológicas e metabólicas podem variar entre espécies (KHAN et al., 2021). Como exemplo, a suplementação de 5 µM de resveratrol elevou significativamente a taxa de maturação nuclear em oócitos suínos (84,5%) (WANG et al., 2019); contudo, reduziu a porcentagem de oócitos maturados de ovinos (56%) (ZABIHI et al., 2019).

Portanto, propõe-se uma avaliação abrangente das concentrações de 10, 30 e 50 µg/mL de OECS no meio de MIV de oócitos suínos, a fim de verificar se tais concentrações podem melhorar a qualidade oocitária *in vitro*.

Quadro 1. Antioxidantes naturais usados na suplementação de meios MIV de oócitos suínos.

Espécie da Planta	Fonte Natural	Melhor concentração	Grupo comparação	Resultados obtidos			Autores
				EROs	Taxa de MII (%)	Taxa de BI (%)	
<i>Rhodiola sachalinensis</i>	Extrato aquoso	6 mg/mL	Ausência do antioxidante	3,25	86	40,9	Wu et al. (2020)
<i>Sasa quepaertensis Nakai</i>	Extrato aquoso	1250 ppm	Ausência do antioxidante	0,86	97,3	27,7	Pyeon et al. (2022)
<i>Quercus robur</i>	Extrato etanólico		cisteína β -mercaptoetanol	--	--	--	Spinaci et al. (2019)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Óleo essencial	20 μ g/mL	cisteamina	--	95,2	--	Santos et al. (2022)

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

I – O OECS na concentração de 10 µg/mL promove uma melhor maturação nuclear e citoplasmática de oócitos suínos quando comparado às concentrações de 30 e 50 µg/mL;

II – A suplementação de 10 µg/mL de OECS reduz os níveis de EROs e controla a atividade bioenergética de oócitos suínos após a MIV;

III – O OECS contendo 10 µg/mL pode ser substituto da cisteamina após a MIV de oócitos suínos.

4 JUSTIFICATIVA

A produção *in vitro* de embriões aplicada à modelos suínos compreende resultados promissores à pecuária, ao passo que exerce um papel fundamental como modelo para pesquisas biotecnológicas. Contudo, o estresse oxidativo gerado pelo acúmulo de EROs resulta em variações nas taxas de sucesso da técnica. Por essa razão, estratégias voltadas para a redução dos danos ocasionados pelo estresse oxidativo oferece a possibilidade da otimização dessa e de outras biotécnicas reprodutivas.

Nesse contexto, a utilização de antioxidantes como suplementação em meios de maturação *in vitro* tem se mostrado como uma ferramenta interessante para a redução dos níveis de EROs. Em destaque, os antioxidantes naturais, como os óleos essenciais apresentam resultados promissores na proteção de gametas ao estresse oxidativo. Nesse sentido, o OECS que é obtido a partir de cascas de *C. sinensis*, fonte residual e industrial, demonstra potencial antioxidante atrelado a propriedades bioquímicas que o tornam uma substância atraente para a suplementação de meios de MIV.

Com base no potencial biológico do OECS, evidenciado por estudos bioquímicos e ensaios celulares *in vitro*, este estudo propõe a utilização o OECS durante a MIV para otimizar as condições do cultivo *in vitro* de oócitos suínos. Assim, nós objetivamos reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo aos oócitos, podendo proporcionar um maior quantitativo de oócitos de boa qualidade.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antioxidante e como o OECS pode melhorar a qualidade da maturação oocitária *in vitro* de oócitos suínos.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade da maturação nuclear e citoplasmática após a MIV de oócitos suínos em meios contendo diferentes concentrações de OECS;

- Avaliar o efeito antioxidante de diferentes concentrações de OECS durante a MIV de oócitos suínos;

- Avaliar se o OECS é capaz de substituir a cisteamina como antioxidante alternativo à MIV de oócitos suínos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Bioética e locais de execução

O presente estudo foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Semiárido (CEUA/nº 23.091.002360/2016-17). O manejo dos animais experimentais ocorreu de conforme as diretrizes de bem-estar estabelecida para cuidado dos animais em abatedouros municipais brasileiros. O experimento ocorreu no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA), sendo a obtenção da casca da laranja, extração e análise química do OECS realizada no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN/Campus Apodi).

6.2 Desenho experimental

O desenho experimental pode ser observado na **Figura 2**.

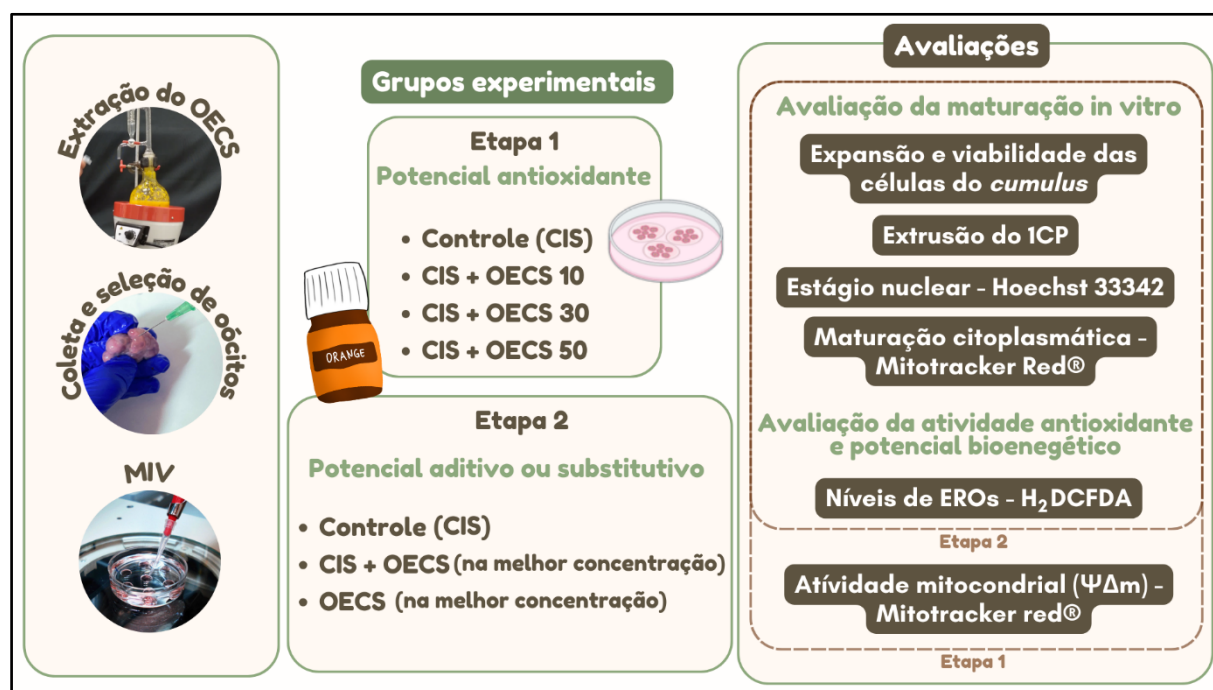


Figura 2. Desenho experimental da avaliação da maturação nuclear, citoplasmática e fisiológica de oócitos suínos após a MIV. Fonte: Autoria própria.

Brevemente, a proposta foi dividida em **duas etapas**. A **primeira etapa** teve como objetivo selecionar dentre as concentrações do OECS, a melhor concentração para uso como

possível substituto à cisteamina. Para tanto, oócitos foram maturados de acordo com os grupos: i) Controle (Cisteamina 100 μ M); ii) Cisteamina + 10 μ g/mL de OECS (CIS + OECS10); iii) Cisteamina + 30 μ g/mL de OECS (OECS30); iv) Cisteamina + 50 μ g/mL de OECS (CIS+OECS50). As concentrações previamente definidas nesse estudo foram baseadas no trabalho realizado por Aquino et al. (2023) utilizando o OECS como antioxidante natural durante a MIV de oócitos bovinos. Após a MIV, oócitos foram avaliados quanto à expansão e viabilidade das células do *cumulus*, presença do primeiro corpúsculo polar (1CP), maturação nuclear e citoplasmática, níveis de EROs e atividade bioenergética ($\Delta\Psi_m$). Nesta etapa, foram realizadas 10 repetições.

Após a seleção da melhor concentração do OECS, foi realizada a **segunda etapa**. Nesse momento, oócitos foram maturados de acordo com os grupos: i) Controle (Cisteamina 100 μ M); ii) Cisteamina + melhor concentração do OECS (CIS + OECS10, 30 ou 50 μ g/mL); iii) Melhor concentração do OECS (10, 30 ou 50 μ g/mL). Finalmente, oócitos suínos maturados foram avaliados quanto à expansão e viabilidade das células do *cumulus*, presença do 1CP e níveis de EROs. Nesta etapa, foram realizadas 3 repetições.

6.3 Extração e análise química do OECS

Laranjas doces e orgânicas foram coletadas na região de Jaguaruana, CE (4°50'02"S, 1359 37°46'51"), nordeste do Brasil. Os frutos foram processados, suas cascas moídas e mantidas em ambiente seco por sete dias. O OECS foi extraído por hidrodestilação utilizando um adaptador tipo Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 5 L, associado a uma manta de aquecimento (CAVEIRO et al., 1970). Brevemente, cascas de *C. sinensis* foram transferidas para um frasco contendo água destilada onde o sistema foi então aquecido a 100 °C. Após 6 h, o óleo essencial foi recuperado e seco por percolação com Na₂SO₄ anidro. Em seguida, as amostras foram armazenadas a 4–8 °C e protegidas da luz.

Posteriormente, a densidade e o rendimento de óleo (% m/m) foram aferidas a 0,84 g.mL⁻¹, e 2,9%, respectivamente. Esses valores foram semelhantes aos descritos por Hildebrand (2019). Para a análise química do OECS, foi realizada a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) utilizando um instrumento Shimadzu QP-2010 Plus sob as seguintes condições: coluna: SH-Rtx-5 (5% difenil e 95% dimetilpolissiloxano) capilar de sílica fundida coluna (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro × 0,25 μ m de diâmetro do filme); gás de arraste: He (1,78 mL/min, em modo de velocidade linear constante); temperatura do injetor: 250 °C, em modo split (1:10); temperatura do detector: 250 °C; programação de

temperatura da coluna: 40–180 °C a 4 °C/min, 180–280 °C a 20 °C/min e, em seguida, 280 °C por 10 min; espectro de massa: impacto de elétrons 70 eV. O volume de amostra injetado foi de 1 µL (1,0 mg de óleo em 1000 µL de diclorometano 99,9% puro).

Os constituintes químicos foram identificados por seus tempos de retenção em cromatografia gasosa em relação aos compostos conhecidos. Os tempos de retenção de cromatografia gasosa foram expressos como índices de Kovat (IK) e calculados por regressão linear e comparando seus espectros de massa com espectros já descritos (ADAMS, 2001). Assim, dois constituintes, D-limoneno e α -terpineol, foram identificados como componentes majoritários (**Tabela 1**).

Tabela 1.. Composição química do óleo essencial de *C. sinensis* (OECS).

Composição química	IK	Rendimento %*	Fórmula química
D-Limoneno	1059	48,5	C ₁₀ H ₁₆
α -terpineol	1188	40,2	C ₁₀ H ₁₈ O
Outros constituintes	--	11,2	--

IK: Índice de Kovat calculado por regressão linear. *A composição % foi a % de área de pico relacionada aos componentes totais do OECS.

6.4 Recuperação dos ovários e seleção dos oócitos

Ovários foram colhidos de fêmeas suínas oriundas do Abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró (AFIM, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil) e transportadas ao laboratório em solução salina aquecida (35–37 °C; NaCl, 0,9%) suplementada com antibiótico (penicilina, 0,05 mg/mL). No laboratório, ovários foram lavados e todos os folículos com diâmetro de 3–6 mm foram aspirados por aspiração folicular usando agulha e seringa (21G/5 mL) e contendo meio de seleção oocitária (MSO) composto por TCM199-HEPES suplementado com 0,3 mM de piruvato de sódio, 5 µg/mL de mio-inositol, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótico/antimicótico.

Posteriormente, o fluido foi depositado em tubos cônicos de 50 mL e mantido em repouso por 15 min para precipitação. Oócitos com uma ou mais camadas completas de células compactas do *cumulus* e citoplasma uniforme foram selecionados sob um estereomicroscópio para MIV (CHOI et al., 2021).

6.5 MIV dos oócitos suínos

Oócitos viáveis apresentando mais de uma camada de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram incubados em MSO acrescido de 20 µg/mL de FSH/LH (Pluset®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil), 10% de fluido folicular suíno (FFS), 5 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF) e diferentes antioxidantes de acordo com o desenho experimental. As estruturas foram distribuídas em gotas (100 µL) cobertas com óleo mineral e agrupadas em 20–30 oócitos por gota durante 44 h a temperatura de 38,5 °C e atmosfera controlada com 6,5% de CO₂ (GAMBINI et al., 2016).

6.6 Avaliação dos oócitos suínos após a MIV

6.6.1 Avaliação das células do *cumulus*

Após 44 h de MIV, oócitos foram analisados usando um estereomicroscópio para avaliação da expansão das células do *cumulus*. As estruturas que apresentaram alta expansão das células do *cumulus* foram consideradas maturadas. Para avaliação da viabilidade celular, as células do *cumulus* foram removidas por meio de pipetagens sucessivas com hialuronidase 0,1%, tendo a suspensão celular corada com azul de tripan (0,2%) e visualizada para contabilização. Células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas de azul) foram contabilizadas nos quatro quadrantes externos de uma câmara de Neubauer (SANTOS et al., 2019).

6.6.2 Análise do corpúsculo polar e estágio nuclear

Os oócitos desnudos foram observados em estereomicroscópio para avaliação da ausência ou presença do 1CP. Quando evidente a presença do 1CP, os oócitos foram considerados maturados. Para avaliação do estágio nuclear, os oócitos foram fixados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e paraformaldeído a 4% por 15 min. As células foram lavadas com PBS e marcadas com Hoechst 33342 (10 µg/mL) por 15 min. Após o tempo decorrido, oócitos foram lavados três vezes em PBS, transferidos para lâminas de vidro e visualizados em microscópio de fluorescência (370 nm). Oócitos com núcleo em metáfase II (placa metafásica, MII) e 1CP foram considerados maturados e aqueles em outra fase nuclear, prófase I, metáfase I, anáfase I e telófase I, foram considerados imaturos (SANTOS et al., 2019).

6.6.3 *Análise da maturação citoplasmática*

Para maturação citoplasmática, foi utilizada a sonda MitoTracker Red[®] (CMXRos, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 500 nM (AMBROGI et al., 2017). Após 30 min de incubação, as imagens foram capturadas usando um microscópio de fluorescência (560 nm). Os oócitos foram classificados como distribuição periférica (oócitos imaturos) ou distribuição dispersa (oócitos maduros).

Ainda, padrões de organização mitocondrial foram classificados em dois grupos conforme relatado por Torner et al. (2004): Padrão A, homogêneo, com pequenas granulações espalhadas pelo citoplasma; e Padrão B: aglomerados heterogêneos, com grandes granulações espalhadas pelo citoplasma ou localizadas em domínios citoplasmáticos específicos. Dessa forma, a presença do Padrão B foi correlacionada com melhores taxas de maturação. As estruturas foram observadas em microscópio de fluorescência com aumento de 40×.

6.7 **Avaliação da atividade antioxidante do OECS**

6.7.1 *Avaliação da quantificação dos níveis de EROs*

Os níveis de EROs foram avaliados por meio da sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para tanto, oócitos desnudos foram lavados duas vezes com PBS e incubados por 30 min a 38,5 °C em 6,5% de CO₂ em 500 µL de PBS contendo de 10 µM de H₂DCFDA (YOU et al., 2010). Os oócitos foram lavados duas vezes com PBS e colocados em lâminas de vidro em gotas para captura de imagem, utilizando um microscópio de fluorescência com aumento de 10× (460 nm). A intensidade de fluorescência (pixels) foi calculada com o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

6.7.2 *Análise do potencial de membrana mitocondrial*

A avaliação da atividade mitocondrial foi estimada por meio do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Para tanto, após 44 h de MIV, oócitos foram incubadas na presença da sonda MitoTracker Red[®] a 500 nM (CMXRos; Invitrogen) em atmosfera controlada com 6,5% de CO₂ por 30 min no escuro a 38,5 °C. Após a incubação, as células foram dispostas em

lâminas de vidro para captura de imagem com um microscópio de fluorescência (560 nm). A avaliação de imagem realizada para medir a intensidade de fluorescência (pixels) foi realizado conforme descrito para a quantificação de EROs (AMBROGI et al., 2017).

6.8 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão e analisados usando StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Para todos os resultados foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para normalidade e o teste de Levene para avaliação da homoscedasticidade. Os dados de análises de EROs, $\Delta\Psi_m$ foram alterados para a função arco seno e analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Outros dados foram comparados por meio do teste qui-quadrado. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Seleção da concentração de OECS durante a MIV de oócitos suínos

Para selecionar a melhor concentração do OECS, foram utilizados 282 ovários, dos quais resultaram 720 oócitos imaturos e viáveis foram submetidos à MIV, resultando em uma média de 2,5 oócitos viáveis por ovário.

7.1.1 Avaliação de diferentes concentrações do OECS sobre a expansão e viabilidade de células do cumulus, maturação nuclear e citoplasmática

Quanto à expansão das células do *cumulus*, CIS+OECS10 foi maior em comparação com CIS+OECS50, mas ambos foram semelhantes a CIS+OECS30 e ao controle (**Tabela 2**) ($P < 0,05$). Contudo, o CIS+OECS50 apresentou uma maior taxa na viabilidade das células do *cumulus* após a análise por ensaio azul de tripan (**Tabela 2**). Adicionalmente, nenhuma diferença foi observada após a avaliação do primeiro corpúsculo polar (**Figura 3a**) e maturação nuclear de oócitos suínos (**Figura 3b**).

Tabela 2. Potencial antioxidante de diferentes concentrações do OECS durante a MIV de oócitos suínos e sua influência sobre as células do *cumulus* e na maturação nuclear.

Grupos	Avaliação das células do <i>cumulus</i>		Avaliação da maturação nuclear	
	Expansão (%)	Viabilidade (%)	1CP (%)	MII (%)
Controle	$64,4 \pm 5,0^{ab}$	$75,1 \pm 4,9^c$	$64,2 \pm 4,3^a$	$77,8 \pm 2,7^a$
	(116/180)	(1862/2479)	(113/176)	(42/54)
CIS+OECS10	$70,8 \pm 4,4^a$	$88,0 \pm 2,6^b$	$66,5 \pm 2,9^a$	$70,2 \pm 2,4^a$
	(126/178)	(3985/4528)	(121/182)	(40/57)
CIS+OECS30	$64,6 \pm 3,7^{ab}$	$87,6 \pm 2,9^b$	$70,1 \pm 4,5^a$	$69,0 \pm 6,3^a$
	(128/195)	(2951/3369)	(122/174)	(40/58)
CIS+OECS50	$57,1 \pm 5,4^b$	$90,3 \pm 2,3^a$	$68,7 \pm 2,1^a$	$75,4 \pm 1,6^a$
	(117/205)	(2623/2903)	(123/179)	(49/65)

^{a,b,c}; Valores com diferentes letras diferem na mesma coluna ($P < 0,05$).

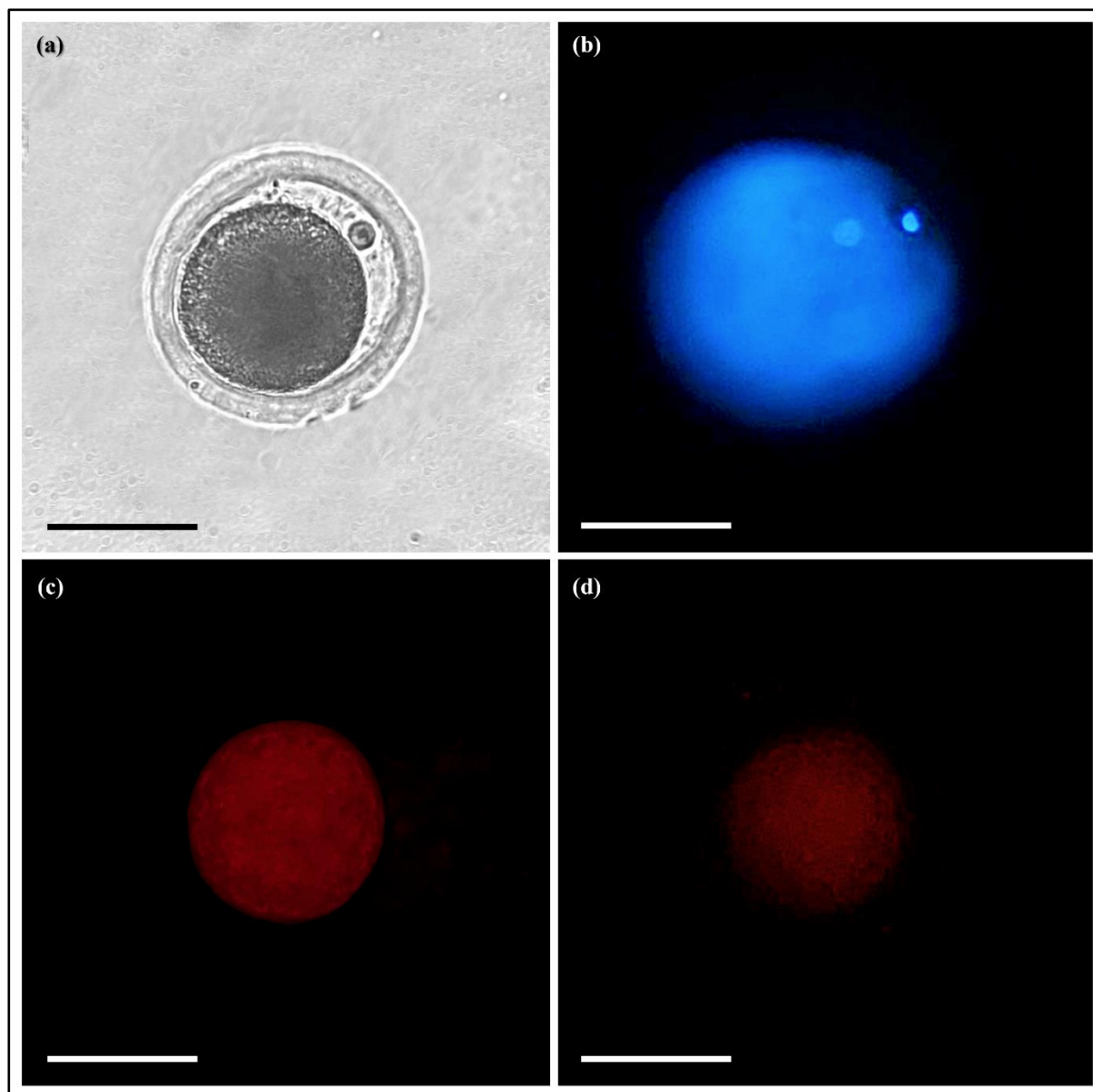


Figura 3. Representação dos estágios de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos suínos suplementados com CIS+OECS50 após 44 horas de MIV. **(a)** Extrusão do primeiro corpo polar (1PB). **(b)** Oócito suíno corado com Hoechst 33342. **(c)** Oócito suíno com mitocôndrias dispersas por todo o citoplasma, exibindo padrões de agregação mitocondrial do tipo B. **(d)** Oócitos suínos com mitocôndrias em transição por todo o citoplasma, exibindo padrões de agregação mitocondrial do tipo A. Barra de escala: 50 μm , ampliação 20 $\times$ **(a, b)**; 100 μm , ampliação 40 $\times$ **(c, d)**.

Após a avaliação da maturação citoplasmática (**Figura 3c-d**), não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, demonstrando taxas acima de 70% (**Figura 4a**). Apesar disso, foi observado que apenas o CIS+OECS50 ($85,7\% \pm 11,1$) foi superior ao grupo

controle ($63,0\% \pm 3,03$), em relação ao padrão de distribuição mitocondrial, embora tenha se mantido similar ao OECS10 ($72,2\% \pm 8,5$) e OECS30 ($75,0\% \pm 6,4$) (**Figura 4b**).

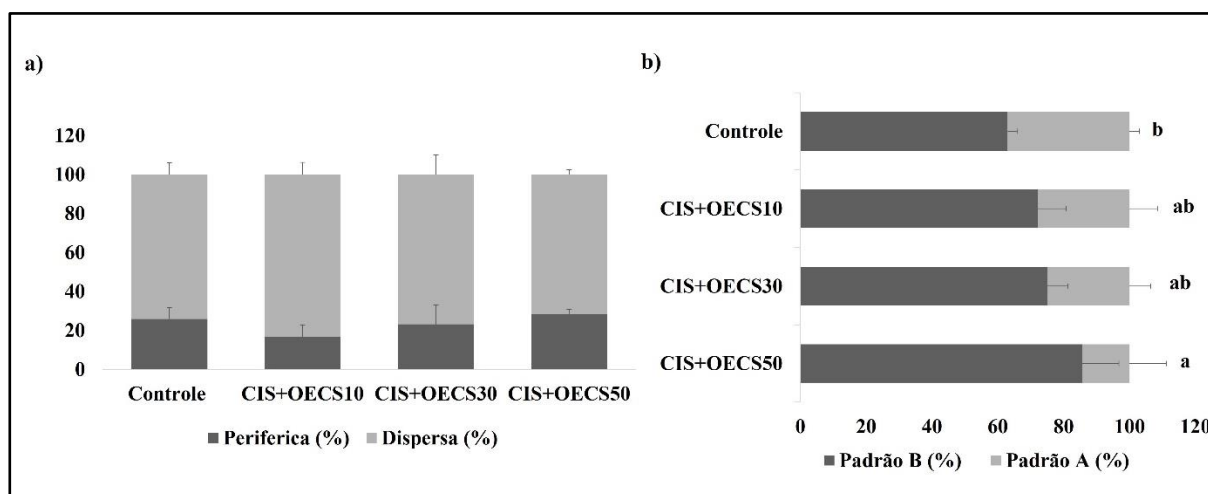


Figura 4. Padrão mitocondrial de oócitos suínos cultivados em meio suplementado com OECS (a) Taxa de distribuição mitocondrial e (b) Padrão de agregação mitocondrial. ^{a,b}; Valores com diferentes letras sobrescritas em colunas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

7.1.2 Avaliação dos níveis de EROs e atividade bioenergética ($\Delta\Psi_m$) de oócitos suínos

Para avaliar os níveis de EROs durante a MIV de oócitos suínos, foi avaliada a unidade arbitrária de fluorescência para cada grupo experimental (**Figura 5a-d**). Assim, foi observado que o CIS+OECS50 ($0,62 \pm 0,17$) reduziu significativamente os níveis de EROs quando comparado ao controle ($1,00 \pm 0,44$) e OECS10 ($1,03 \pm 0,45$), embora tenha sido similar ao OECS30 ($0,62 \pm 0,17$) (**Figura 5e**). Após a avaliação da $\Delta\Psi_m$ (**Figura 5f-i**), não foi observada diferença entre os grupos avaliados (**Figura 5j**). Portanto, considerando os resultados nesta etapa, foi considerada para a etapa seguinte a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de OECS.

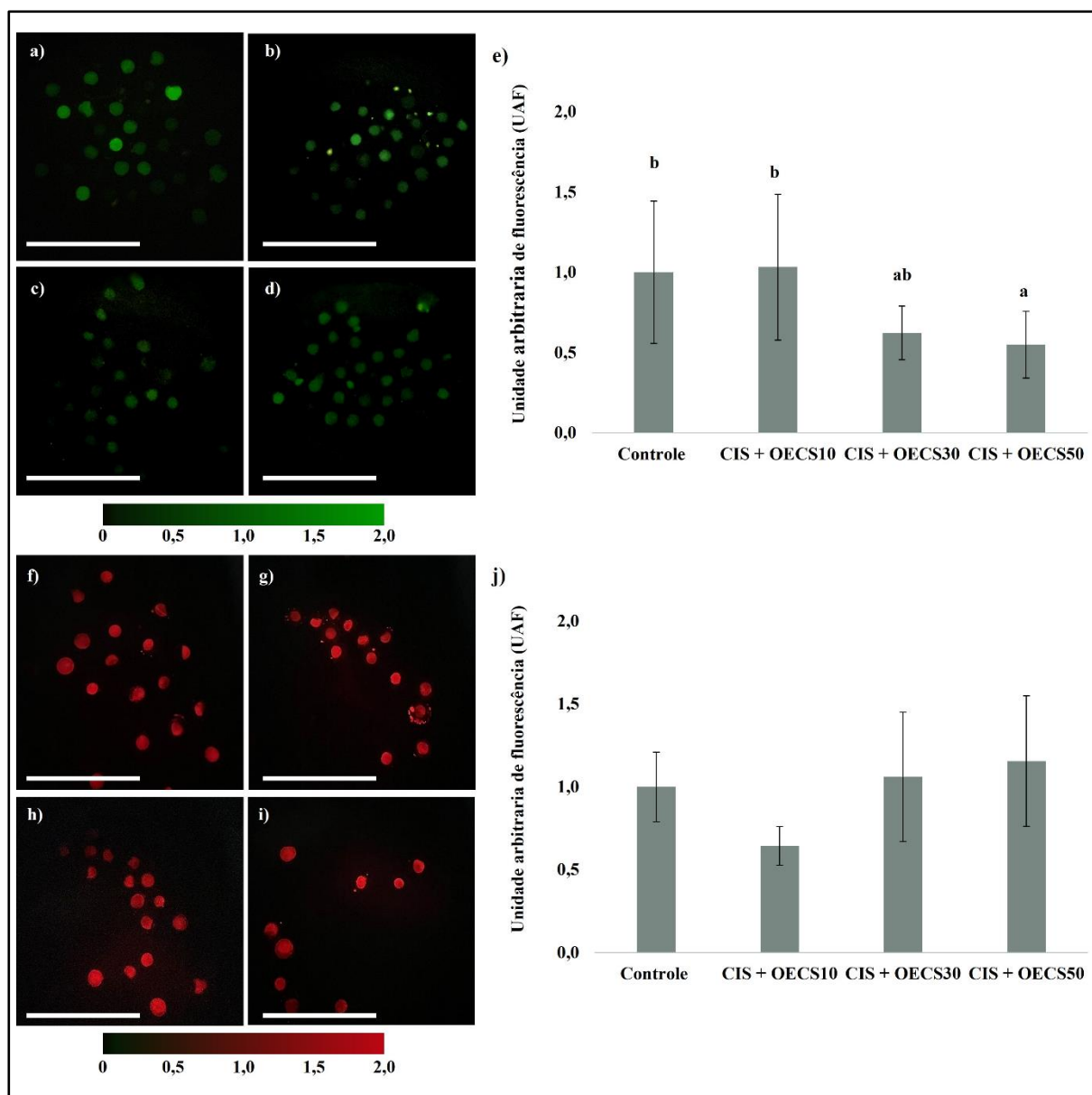


Figura 5. Avaliação dos níveis de ROS intracelulares e $\Delta\Psi_m$ em oócitos suínos suplementados com antioxidantes após 44 horas de MIV. **(a-d)** Representação de oócitos suínos após coloração com a sonda fluorescente H₂DCFDA. **(e)** Quantificação de unidades arbitrárias de fluorescência de EROs após MIV de oócitos suínos com diferentes suplementos. **(f-i)** Representação de oócitos suínos após coloração com a sonda fluorescente MitoTracker Red® (CMXRos). **(j)** Quantificação de unidades arbitrárias de fluorescência de $\Delta\Psi_m$ após MIV de oócitos suínos com diferentes suplementos. Barra de escala: 50 μ m, ampliação 20 $\times$ (a, b, c, d, f, g, h, i). ^{a,b}; Valores com diferentes letras sobrescritas em colunas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

7.2 Efeito sinérgico ou substituível do OECS50 durante a MIV de oócitos suínos

Considerando que na etapa anterior, o grupo contendo 50 µg/mL de OECS, foi capaz de melhorar a viabilidade das células do *cumulus*, melhorar a maturação citoplasmática e reduzir a geração intracelular de EROs, agora o seu efeito sinérgico ou substituível em relação a cisteamina como antioxidante foi avaliado. Nessa etapa, foram utilizados 54 ovários, que permitiu a obtenção de 141 oócitos inviáveis e imaturos, perfazendo 2,6 oócitos/ovário, dos quais foram distribuídos nos grupos desta etapa.

7.2.1 Avaliação do OECS50 sobre a expansão e viabilidade das células do *cumulus*, primeiro corpúsculo polar de oócitos suínos e níveis de EROs

Os resultados obtidos após as avaliações podem ser observados na **Tabela 4**. Quanto à expansão das células do *cumulus* (**Figura 6**) não foi observada diferença entre os grupos, embora OECS50 foi superior ao controle e CIS+OECS50 para a viabilidade das células do *cumulus* (**Tabela 4**). Nenhuma diferença foi observada após a avaliação do 1CP entre os grupos experimentais (**Tabela 4**).

Tabela 4. Potencial antioxidante do OECS durante a MIV de oócitos suínos e sua influência sobre as células do *cumulus* e na maturação nuclear.

Grupos	Avaliação de células do <i>cumulus</i>		Avaliação da maturação nuclear
	Expansão (%)	Viabilidade (%)	1CP (%)
Controle	100 ± 0,0 ^a	88,4 ± 1,1 ^b	74,4 ± 1,6 ^a
	(43/43)	(604/683)	(32/43)
CIS + OECS50	100 ± 0,0 ^a	81,7 ± 3,1 ^c	80,4 ± 0,7 ^a
	(45/45)	(805/985)	(33/41)
OECS50	100 ± 0,0 ^a	92,4 ± 0,6 ^a	78,0 ± 1,1 ^a
	(51/51)	(1040/1125)	(39/50)

^{a,b}; Valores com diferentes letras sobrescritas diferem na mesma coluna (P < 0,05).

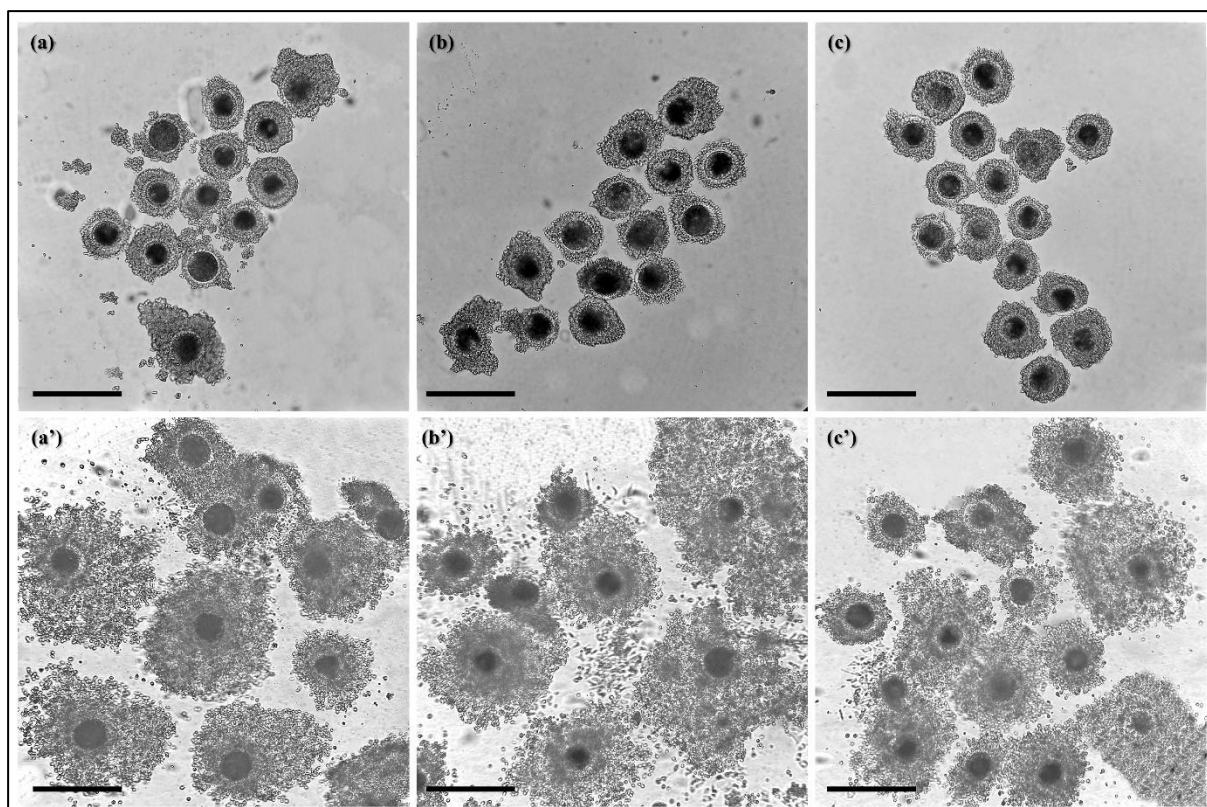


Figura 6. Representação de oócitos suínos após 44 h de MIV suplementado com cisteamina, OECS50 ou uma combinação desses antioxidantes. (a-a') 100 μ M de cisteamina (CIS). (b-b') Concentração de OECS50 com CIS (CIS+OECS50). (c-c') Concentração de OECS50 (OECS50). Barra de escala: 50 μ m, ampliação 10 $\times$ (a-a', b-b', c-c').

Após a avaliação dos níveis de EROs, não foi observada diferença entre os grupos (**Figura 7a-c**), sendo constatado os seguintes valores: CIS ($1,00 \pm 0,63$), CIS + OECS50 ($1,02 \pm 0,46$) e OECS50 ($0,79 \pm 0,37$). Esses resultados destacam a homogeneidade dos níveis de EROs nos diferentes grupos, indicando a similaridade notável em termos do controle do estresse oxidativo e destaca o potencial substitutivo do OECS à cisteamina na PIVE em suínos (**Figura 7d**).

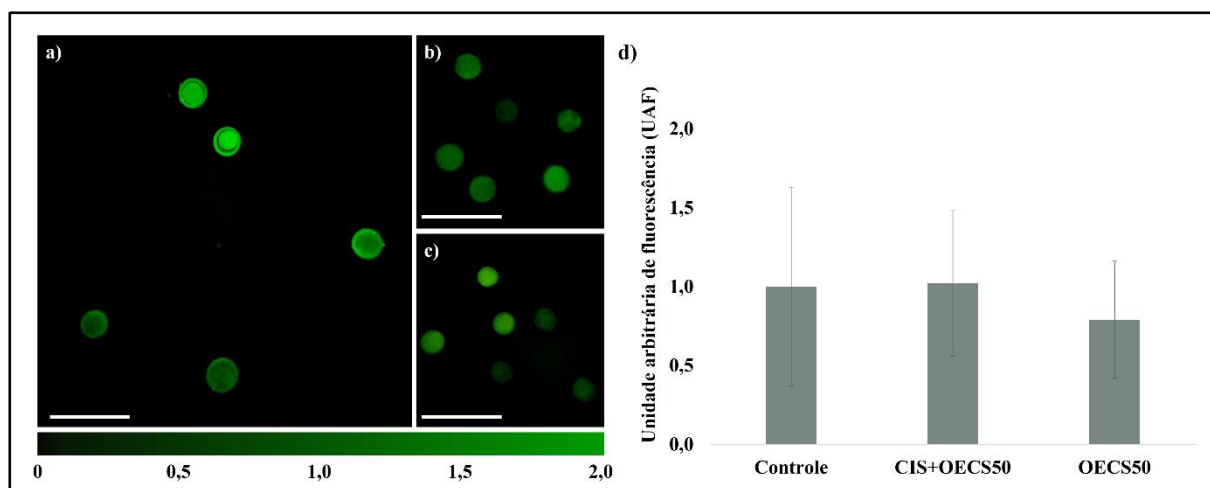


Figura 7. Avaliação dos níveis de EROs intracelulares após 44 horas de MIV de oócitos suínos. **(a-c)** Representação de oócitos suínos corados com a sonda fluorescente H₂DCFDA sob diferentes suplementos. **(d)** Quantificação de unidades arbitrárias de fluorescência de EROs após MIV de oócitos suínos com diferentes suplementos antioxidantes. Barra de escala: 50 μm, ampliação 20× (a, b, c). ($p > 0,05$).

8 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, nós demonstramos o uso do OECS durante a MIV de oócitos suínos, podendo este antioxidante natural ser utilizado na presença ou ausência como substituto à cisteamina. Neste sentido, nós avaliamos em um primeiro momento, diferentes concentrações do OECS na presença de cisteamina, e nós observamos que o CIS+OECS50 melhorou significativamente a viabilidade das células do *cumulus*, o padrão de agregação mitocondrial e reduziu os níveis intracelulares de EROs.

As células do *cumulus* atuam como intermediadores entre o gameta e o meio de cultivo, exercendo papel fundamental na proteção e estímulo ao desenvolvimento do oócitos durante a MIV (EPPIG, 1982). Além disso, considerando as condições fisiologia *in vivo* da maturação oocitária, a maior competência de desenvolvimento de oócitos de boa qualidade estão fortemente relacionadas aos aspectos morfológicos e funcionais das células do *cumulus* (TATEMOTO; LEE, 2020). Por este motivo, a expansão e a viabilidade dessas células são frequentemente associadas a qualidade dos oócitos (WONGSRIKEAO et al., 2005; LEE et al., 2018). Assim, sobre a expansão das células do *cumulus*, observamos que CIS+OECS10, promoveu uma maior taxa de expansão de células quando comparado ao grupo CIS+OECS50. Além disso, CIS+OECS30 e o grupo controle mantiveram resultados similares a CIS+OECS10 e CIS+OECS50.

Quanto à viabilidade das células do *cumulus*, nós observamos que a suplementação do meio MIV com OECS promoveu de forma eficiente um maior número de células viáveis quando comparada ao grupo controle. Nesse contexto, o grupo CIS+OECS50 se sobressaiu, apresentando valores ainda mais elevados em relação aos demais grupos. Esse resultado se destaca, uma vez que as células do *cumulus* são estruturas que revestem os oócito e estão mais expostas as condições *in vitro*, e por esta razão, uma melhor taxa de viabilidade pode colaborar para a manutenção e qualidade de oócitos após a MIV (OLIVEIRA et al., 2019). Em um estudo anterior, a ação antioxidante do OECS sobre as células do *cumulus* já foi retratado em oócitos bovinos, onde a suplementação do óleo essencial demonstrou taxas semelhantes a grupos cisteamina (AQUINO et al., 2023).

Embora o OECS não tenha diferido entre os grupos avaliados após a análise do 1CP e metáfase II, esse resultado foi positivo, pois indica que o OECS não interferiu negativamente na progressão da maturação nuclear. Isso sugere que o OECS pode ser usado como um aditivo no meio de MIV sem prejudicar a maturação nuclear dos oócitos, o que é crucial para a fertilização bem-sucedida e o desenvolvimento subsequente do embrião.

Apesar de não ter havido diferença entre os grupos após a maturação nuclear, foi observado em nosso estudo que o CIS+OECS50 foi superior a cisteamina após a análise do padrão de distribuição mitocondrial B. Isso é refletido porque o CIS+OECS50 promoveu uma melhor organização e distribuição das mitocôndrias, o que é crucial para a função e eficiência energética do oócito durante a maturação (KRISHER et al., 2004). A maturação citoplasmática está relacionada a um conjunto de eventos citoplasmáticos que preparam o oócito para a fertilização e competência de desenvolvimento embrionário e ocorre simultaneamente a maturação nuclear (ABEYDEERA, 2002). Este processo inclui a redistribuição de organelas citoplasmática, que é fundamental para a competência de desenvolvimento do embrião (CHOI et al., 2021).

Após a avaliação dos níveis de EROs, nós observamos em nosso estudo que o CIS+OECS50 diferiu do grupo controle, embora tenha se mantido similar ao CIS+OECS30. Esse resultado pode estar relacionado a concentração dos constituintes químicos do OECS sendo o D-limoneno um dos mais proeminentes e com propriedades bioativas já descritas (SHAH; MEHTA, 2018; FERRONATO; ROSSI, 2018). Bai et al. (2016) demonstraram durante o cultivo de células do cristalino humano (HLECs) que o D-limoneno foi capaz de reduzir a geração de EROs, bem como inibir a apoptose celular induzida por H₂O₂ um dos principais compostos reativos responsáveis por danos aos oócitos maturados *in vitro*. O α -terpineol é outro constituinte químico do OECS que pode estar relacionado a sua atividade antioxidantes (CHOPRA et al., 2021). Em um estudo anterior, este monoterpene mostrou ter ação antioxidante significativa em estudo *in vitro*, por meio da capacidade de remoção do radical hidroxila e do óxido nítrico, prevenindo a formação de ácido tiobarbitúrico que corresponde ao processo de peroxidação lipídica (SILVA et al., 2011). Além disso, Bica et al. (2011), em testes avaliando a capacidade de absorção de radicais de oxigênio, observaram que 2,72 μ M α -terpineol desempenhou papel efetivo na eliminação de radicais livres.

As mitocôndrias são organelas presentes no citoplasma, responsáveis pelo fornecimento de energia para as células, por meio da respiração celular. Neste sentido, a integridade funcional das mitocôndrias tem revelado papel importante como indicativo de qualidade do desenvolvimento de oócitos (KANG et al., 2021). A análise de $\Delta\Psi_m$ é um parâmetro fundamental para aferir o efeito do OECS sobre a função bioenergética de oócitos. Logo, embora a suplementação combinada de antioxidantes não tenha reduzido os níveis de $\Delta\Psi_m$, o OECS não se mostrou tóxico às células, possibilitando altas taxas de maturação oocitária conforme demonstrado em um modelo bovino (AQUINO et al., 2023).

Portanto, considerando na primeira etapa que o CIS+OECS50 foi considerado como

melhor grupo a ser utilizado como um substituível a cisteamina, essa concentração foi avaliada na segunda etapa quanto a sua capacidade sinérgica ou isolada da cisteamina. Quanto à expansão das células do *cumulus*, nenhuma diferença foi observada entre os grupos avaliados, e embora isso tenha ocorrido, uma maior viabilidade das células do *cumulus* foi observada no OECS50 isolado da cisteamina. Nós acreditamos que esse resultado possa estar relacionado ao controle de radicais livres responsáveis pela peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica ocorre nas cadeias laterais polinsaturados da membrana plasmática e de outras organelas que apresentem lipídeos (WANG et al., 2017). O estresse oxidativo provoca a lipoperoxidação, que consequentemente, induz modificações intensas na estrutura e permeabilidade da membrana celular, modificando o trânsito de íons e resultando na perda da seletividade de entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas nas células (MARIO et al., 2022; COSTA et al., 2022). Assim, é plausível supor que o controle da produção de radicais livres exercido pelo OECS50, favoreceu uma melhor viabilidade as células do *cumulus*.

Além disso, nenhuma diferença em nosso estudo foi observada após a análise sinérgica ou isolada do OECS quanto ao 1CP, e isso pode ser um resultado positivo, pois nenhuma diferença foi observada entre os grupos analisados após a quantificação dos níveis de EROs. Esse resultado pode estar relacionado a proporção ou até os mecanismos de atuação dos agentes antioxidantes testados, o que demonstra a complexidade do desenvolvimento oocitário e a suscetibilidade a múltiplos fatores.

Finalmente, o OECS50 pode ser considerado uma alternativa viável para a cisteamina na MIV de oócitos suínos. Isso se deve à sua capacidade de controlar efetivamente os radicais livres, promover a viabilidade celular e manter a maturação citoplasmática, sem comprometer a progressão da maturação nuclear. Esses resultados destacam o potencial do OECS50 como um aditivo eficaz e de baixo custo para a MIV de oócitos suínos, permitindo novas possibilidades para a melhoria da eficiência reprodutiva suína.

9 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra pela primeira vez a eficácia da suplementação combinada do OECS em diferentes concentrações na proteção contra danos causados pelo estresse oxidativo durante a MIV de oócitos suínos. Notavelmente, a concentração de 50 µg/mL de OECS se destacou ao promover uma maior taxa de viabilidade nas células do *cumulus*, melhorar a maturação citoplasmática e reduzir mais expressivamente as EROs.

Além disso, a concentração de 50 µg/mL de OECS, quando usada isoladamente, mostrou-se uma alternativa potencial para substituir a cisteamina nos programas de MIV suína. Isso se deve não apenas ao seu bom desempenho na promoção da retomada meiótica e manutenção do estado redox, mas também a possibilidade de utilizar resíduos da indústria alimentícia como fonte de obtenção de baixo custo. Esses resultados permitem caminhos para futuras pesquisas e aplicações práticas na melhoria da eficiência reprodutiva suína.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYDEERA, L.R. *In vitro* production of embryos in swine. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 257-273, 2002.

ABEYDEERA, L.R. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 747-756, 1998.

ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Carol Stream: Allured publishing corporation**, v. 456, p. 544-545, 2007.

AGARWAL, A.; MALDONADO ROSAS, I.; ANAGNOSTOPOULOU, C.; CANNARELLA, R.; BOITRELLE, F.; MUNOZ, L.V.; FINELLI, R.; DURAIRAJANAYAGAM D.; HENKEL R.; SALEH, R. Oxidative stress and assisted reproduction: A comprehensive review of its pathophysiological role and strategies for optimizing embryo culture environment. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 477, 2022.

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 42, 2017.

AMBROGI, M.; DALL'ACQUA, P.C.; ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; MINGOTI, G.Z. Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and antioxidants: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 409-421, 2017.

AQUINO, L.V.C.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, L.R.M.; MOURA, Y.B.F.; NASCIMENTO, T. L.; BERTINI, L.M., PEREIRA, A.F. Antioxidant effects of *Citrus sinensis* peel essential oil in a bovine oocyte model. **Livestock Science**, v. 276, p. 105324, 2023.

BARROZO, L.G.; PAULINO, L.R.; SILVA, B.R.; BARBALHO, E.C.; NASCIMENTO, D.R.; LIMA NETO, M.F.; SILVA, J.R. N-acetyl-cysteine and the control of oxidative stress during in

vitro ovarian follicle growth, oocyte maturation, embryo development and cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 231, p. 106801, 2021.

BASTOS, D.C.; FERREIRA, E.A.; PASSOS, O.S.; DE SÁ, J.F.; ATAÍDE, E.M., CALGARO, M. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, v. 35, p. 36–45, 2014.

BEHESHTI, R.; MOHAMMADI-ROSHANDEH, A.; GIASI GHALEHKANDI, J.; GHAEMMAGHAMI, S.; HOUSHANGI, A. F. Effect of antioxidant supplements on *in vitro* maturation of bovine oocyte. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, n. 7, p. 1473-1475, 2011.

BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1610-1615, 2011.

BUCCI, D.; MOURA, A.A.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C. Oxidative stress in pig semen preservation: How to deal with it? **Revista Brasileiro de Reprodução Animal**, v. 45, n. 4, p. 329-334, 2021.

BUDANI, M.C.; TIBONI, G.M. Effects of supplementation with natural antioxidants on oocytes and preimplantation embryos. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 612, 2020.

CHAUBE, S.K.; SHRIVASTAV, T.G.; TIWARI, M.; PRASAD, S.; TRIPATHI, A.; PANDEY, A.K. Neem (*Azadirachta indica* L.) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2014.

CHEN, P.R., REDEL, B.K., KERNS, K.C., SPATE, L.D., PRATHER, R.S. Challenges and considerations during *in vitro* production of porcine embryos. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2770, 2021.

CHEN, P.R., REDEL, B.K., KERNS, K.C., SPATE, L.D., PRATHER, R.S. Challenges and considerations during *in vitro* production of porcine embryos. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2770, 2021.

CHEN, X.; XUAN, B., XU, D., WANG, Q.; CHENG, M.; JIN, Y. Crocin supplementation during oocyte maturation enhances antioxidant defence and subsequent cleavage rate. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 2, p. 300-308, 2019.

CHOI, H.; LEE, J.; YOON, J.D.; HWANG, S.U.; CAI, L.; KIM, M.; KIM, G.; OH, D.; KIM, E.; HYUN, S.H. The effect of copper supplementation on *in vitro* maturation of porcine cumulus-oocyte complexes and subsequent developmental competence after parthenogenetic activation. **Theriogenology**, v. 164, p. 84-92, 2021.

CHOPRA, B.; DHINGRA, A.K.; DHAR, K.L.; NEPALI, K. Emerging role of terpenoids for the treatment of cancer: A review. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 16, p. 2300-2336, 2021.

COLOMBO, M.; ALKALI, I.M.; PROCHOWSKA, S.; LUVONI, G. C. Fighting like cats and dogs: Challenges in domestic carnivore oocyte development and promises of innovative culture systems. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 2135, 2021.

COSTA, F.G.; VASCONCELOS, E.M.; SILVA, J.R. V., LIZA, A.; BATISTA, P.S. Influence of reactive oxygen species during *in vitro* culture of ovarian oocytes and follicles of domestic mammals. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 46, n. 1, p. 28-42, 2022.

CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. **Journal of Chemical Education**, v. 53, n. 10, p. 652, 1976.

CURRIN, L.; GLANZNER, W.G.; GUTIERREZ, K.; MACEDO, M.P.; GUAY, V.; BALDASSARRE, H.; VILCEU, B. Optimizing swine *in vitro* embryo production with growth factor and antioxidant supplementation during oocyte maturation. **Theriogenology**, v. 194, p. 133-143, 2022.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. e476-e482, 2010.

EL-MAATI, M.F.A.; MAHGOUB, S.A.; LABIB, S.M.; AL-GABY, A.M.; RAMADAN, M.F.

Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, n. 4, p. 494-504, 2016.

EPPIG, J.J. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. **Developmental Biology**, v. 89, n. 1, p. 268-272, 1982.

FARAHMANDFAR, R.; TIRGARIAN, B.; DEHGHAN, B.; NEMATI, A. Changes in chemical composition and biological activity of essential oil from Thomson navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) peel under freezing, convective, vacuum, and microwave drying methods. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 124-138, 2020.

FAVELA-HERNÁNDEZ, J.M.J.; GONZÁLEZ-SANTIAGO, O.; RAMÍREZ-CABRERA, M. A.; ESQUIVEL-FERRIÑO, P.C.; CAMACHO-CORONA, M.D.R. Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 247, 2016.

FERRONATTO, A.N.; ROSSI, R.C. Extração e aplicação do óleo essencial da casca da laranja como um ingrediente natural. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 12, n. 2, 2018.

GAMBINI, A.; STÉFANO, A.; JARAZO, J.; BUEMO, C.; KARLANIAN, F.; SALAMONE, D.F. Embryo aggregation does not improve the development of interspecies somatic cell nuclear transfer embryos in the horse. **Theriogenology**, v. 86, p. 1081-1091, 2016.

GERACI, A.; DI STEFANO, V.; DI MARTINO, E.; SCHILLACI, D.; SCHICCHI, R. Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. **Natural product research**, v. 31, n. 6, p. 653-659, 2017.

GILCHRIST, R.B.; LUCIANO, A.M.; RICHANI, D.; ZENG, H.T.; WANG, X.; DE VOS, M.; SUGIMURA, S.; SMITZ, J.; RICHARD, F.J.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v. 152, n. 5, p. R143-R157, 2016.

GRUPEN, C.G. The evolution of porcine embryo *in vitro* production. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 24-37, 2014.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

HILDEBRANDT, T.B.; HERMES, R.; COLLEONI, S.; DIECKE, S.; HOLTZE, S.; RENFREE, M.B.; STEJSKAL, J.; HAYASHI, K.; DRUKKER, M.; LOI, P.; GÖRITZ, F.; LAZZARI, G.; GALLI, C. Embryos and embryonic stem cells from the white rhinoceros. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 2589, 2018.

HU, X.; CHENG, L.; WANG, X.; LUO, G.; ZHAO, T.; TIAN, J.; AN, L. N-acetyl-l-cysteine protects porcine oocytes undergoing meiotic resumption from heat stress. **Reproductive Toxicology**, v. 91, p. 27-34, 2020.

JIAO, Y.; WANG, Y.; JIANG, T.; WEN, K.; CONG, P.; CHEN, Y.; HE, Z. Quercetin protects porcine oocytes from *in vitro* aging by reducing oxidative stress and maintaining the mitochondrial functions. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 915898, 2022

KALA, M.; SHAIKH, M.V.; NIVSARKAR, M. Equilibrium between antioxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 16, n. 1, p. 28-35, 2017.

KANG, H.G.; LEE, S.; JEONG, P.S.; KIM, M.J.; PARK, S.H.; JOO, Y.E.; PARK, S.H.; SONG, B.S.; KIM, S.U.; KIM, M.K.; SIM, B.W. Lycopene improves *in vitro* development of porcine embryos by reducing oxidative stress and apoptosis. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 230, 2021.

KANG, J.T.; KWON, D.K.; PARK, S. J.; KIM, S.J.; MOON, J. H.; KOO, O.J.; GOO, J.; LEE, B.C. Quercetin improves the *in vitro* development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. **Journal of Veterinary Science**, New York, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2013.

KHAN, R., JIANG, X., HAMEED, U., SHI, Q. Role of lipid metabolism and signaling in mammalian oocyte maturation, quality, and acquisition of competence. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 639704, 2021.

KHAZAEI, M.; AGHAZ, F. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during *in vitro* maturation of oocytes. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 11, n. 2, p. 63, 2017.

KOBAYASHI, M.; LEE, E. S.; FUKUI, Y. Cysteamine or β -mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1191-1199, 2006.

KRISHER, R.L.; BRAD, A.M.; HERRICK, J.R.; SPARMAN, M.L.; SWAIN, J.E. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. **Animal reproduction science**, v. 98, n. 1-2, p. 72-96, 2007

KWAK, S.S.; CHEONG, S.A.; JEON, Y.; LEE, E.; CHOI, K.C.; JEUNG, E.B.; HYUN, S.H. The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 78, n. 1, p. 86-101, 2012.

LEE, S.; JIN, J.X.; TAWEECHAIPASANKUL, A.; KIM, G.A.; LEE, B.C. Synergistic effects of resveratrol and melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocytes and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 114, p. 191-198, 2018.

LEE, S.; KANG, H.G.; JEONG, P.S.; NANJIDSUREN, T.; SONG, B.S.; JIN, Y.B.; LEE, S.R.; KIM, S.U.; SIM, B.W. Effect of oocyte quality assessed by brilliant cresyl blue (BCB) staining on cumulus cell expansion and sonic hedgehog signaling in porcine during *in vitro* maturation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4423, 2020.

LI, R.; LAI, L.; WAX, D.; HAO, Y.; MURPHY, C.N.; RIEKE, A.; SAMUEL, M.; LINVILLE, M.L.; KORTE, S.W.; EVANS, R.W.; TURK, J.R.; KANG, J.X.; WITT, W.T.; DAI, Y.; PRATHER, R. S. Cloned transgenic swine via *in vitro* production and cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 2, p. 226-230, 2006.

LI, Y.; TANG, C.; HE, Q. Effect of orange (*Citrus sinensis* L.) peel essential oil on characteristics of blend films based on chitosan and fish skin gelatin. **Food Bioscience**, v. 41, p. 100927, 2021.

- 929
- 930 LIANG, S.; GUO, J.; JIN, Y. X.; YUAN, B.; ZHANG, J. B.; KIM, N. H. C-Phycocyanin
931 supplementation during *in vitro* maturation enhances pre-implantation developmental
932 competence of parthenogenetic and cloned embryos in pigs. **Theriogenology**, v. 106, p. 69-78,
933 2018.
- 934
- 935 LIN, C. M.; SHEU, S.R.; HSU, SC.; TSAI, Y. H. Determination of bactericidal efficacy of
936 essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. **Food Control**, v. 21, n.
937 12, p. 1710-1715, 2010.
- 938
- 939 LIN, X.; CAO, S.; SUN, J.; LU, D.; ZHONG, B.; CHUN, J. The chemical compositions, and
940 antibacterial and antioxidant activities of four types of Citrus essential oils. **Molecules**, v. 26,
941 n. 11, p. 3412, 2021.
- 942
- 943 LINH, N.V.; THANH, D.N.Q.; OZAWA, M.; NGUYEN, B.X.; KIKUCHI, K.; NAGAI, T. 247
944 Effects of cysteine in IVM media on *in vitro* maturation under low oxygen tension, *in vitro*
945 fertilization, and *in vitro* culture of porcine oocytes. **Reproduction, Fertility and**
946 **Development**, v. 20, n. 1, p. 203-203, 2008.
- 947
- 948 LINS, T. L.B.G.; CAVALCANTE, A.Y.P.; SANTOS, J.M.S.; MENEZES, V.G.; BARROS,
949 V.R.P.; BARBERINO, R.S.; BEZERRA, M.É.S.; MACEDO, T.J.S.; MATOS, MH. T. Rutin can
950 replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of
951 sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 263-270, 2017.
- 952
- 953 LIU, X.; LI, P.; YAN, K.; DU, Y.; PENG, K.; LI, M.; CUI, K.; ZHANG, H.; YANG, X.; LU, S.;
954 LIANG, X. Resveratrol ameliorates the defects of meiotic maturation in lipopolysaccharide
955 exposed porcine oocytes. **Reproductive Toxicology**, v. 115, p. 85-93, 2023.
- 956
- 957 MAGALHÃES, M.L.; IONTA, M.; FERREIRA, G.Á.; CAMPIDELLI, M.L.L.; NELSON,
958 D.L.; FERREIRA, V.R.F.; REZENDE, D.A.C.S.; CARDOSO, M.D.G. Biological activities of
959 the essential oil from the Moro orange peel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Flavour and**
960 **Fragrance Journal**, v. 35, n. 3, p. 294-301, 2020.
- 961

- 962 MARQUES, M. G.; ZANELLA, R. What will make swine IVP come to commercial use?
 963 **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 45, n. 4, p. 559-565, 2021.
 964
- 965 MASTROROCCHO, A.; MARTINO, N.A.; MARZANO, G.; LACALANDRA, G.M.; CIANI,
 966 E.; ROELEN, B.A.J.; DELL'AQUILA, M.E.; MINERVINI, F. The mycotoxin beauvericin
 967 induces oocyte mitochondrial dysfunction and affects embryo development in the juvenile
 968 sheep. **Molecular Reproduction and Development**, v. 86, n. 10, p. 1430-1443, 2019.
 969
- 970 MATEO-OTERO, Y.; YESTE, M.; DAMATO, A.; GIARETTA, E. Cryopreservation and
 971 oxidative stress in porcine oocytes. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 20-26, 2021.
 972
- 973 MERTON, J.S.; KNIJN, H.M.; FLAPPER, H.; DOTINGA, F.; ROELEN, B.A.J.; VOS,
 974 P.L.A.M.; MULLAART, E. Cysteamine supplementation during in vitro maturation of
 975 slaughterhouse-and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without
 976 affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v. 80, n. 4,
 977 p. 365-371, 2013.
 978
- 979 NIE, J.; YAN, K.; SUI, L.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; YANG, X.; LU, S.; LU, K.; LIANG, X.
 980 Mogroside V improves porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic
 981 development. **Theriogenology**, v. 141, p. 35-40, 2020.
 982
- 983 NIEMANN, H.; RATH, D. Progress in reproductive biotechnology in swine. **Theriogenology**,
 984 v. 56, n. 8, p. 1291-1304, 2001.
 985
- 986 OLIVEIRA, L.R.M.; SANTOS, M.V.O.; BERTINI, L.M.; PEREIRA, A. F. Bioguided isolation
 987 of compounds with antioxidant activity to improve the *in vitro* maturation of mammalian
 988 oocytes. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e117985137-e117985137, 2020.
 989
- 990 PAN, C.; CHEN, J.; CHEN, Y.; LU, Y.; LIANG, X.; XIONG, B.; LU, Y. Mogroside V
 991 ameliorates the oxidative stress-induced meiotic defects in porcine oocytes in vitro.
 992 **Reproductive Toxicology**, v. 111, p. 148-157, 2022.
 993
- 994 PYEON, D.B.; LEE, S.E.; YOON, J.W.; PARK, H. J.; OH, S.H.; LEE, DG.; KIM, E. Y.; PARK,
 995 S.P. Comparison of the improving embryo development effects of *Sasa quelpaertensis* Nakai

extract, p-coumaric acid, and myricetin on porcine oocytes according to their antioxidant capacities. **Theriogenology**, v. 185, p. 97-108, 2022.

RAKHA, S.I.; ELMETWALLY, M.A.; EL-SHEIKH ALI, H.; BALBOULA, A.; MAHMOUD, A.M.; ZAABEL, S.M. Importance of Antioxidant Supplementation during In Vitro Maturation of Mammalian Oocytes. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 439, 2022.

RAMANA, K.V.; REDDY, A.; MAJETI, N. V.; SINGHAL, S.S. Therapeutic potential of natural antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-3, 2018.

ROBERTO, D.; MICUCCI, P.; SEBASTIAN, T.; GRACIELA, F.; ANESINI, C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 1, p. 38-44, 2010.

ROMAR, R.; CÁNOVAS, S.; MATÁS, C.; GADEA, J.; COY, P. Pig in vitro fertilization: Where are we and where do we go? **Theriogenology**, v. 137, p. 113-121, 2019.

SAMUNI, Y.; GOLDSTEIN, S.; DEAN, O.M.; BERK, M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 8, p. 4117-4129, 2013.

SANTOS, M.V.O.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F. Use of natural antioxidants in vitro mammalian embryo production. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 431-443, 2018.

SANTOS, M.V.O.; NASCIMENTO, L.E.; PRAXEDES, É.A.; BORGES, A.A.; SILVA, A.R.; BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during in vitro bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. **Theriogenology**, v. 128, p. 74-80, 2019.

SANTOS, M. V. O.; OLIVEIRA, L. R. M.; OLIVEIRA, A. R. S.; PRAXEDES, ÉRIKA A.; BERTINI, L.M.; PEREIRA, A. F. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during in vitro maturation improves the rates of cumulus cell expansion and metaphase II in porcine oocytes. **19th International Congress on Animal Reproduction**, 2022.

- 1030
1031 SHAH, B.B.; MEHTA, A.A. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of D-Limonene. Asian
1032 **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 883-887, 2018.
1033
- 1034 SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on
1035 growth and morphogenesis of Aspergillus niger (L.) Van Tieghem. **Microbiological research**,
1036 v. 163, n. 3, p. 337-344, 2008.
1037
- 1038 SIDDIQUI, S.A.; PAHMEYER, M.J.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S.M. Extraction and
1039 purification of d-limonene from orange peel wastes: Recent advances. **Industrial Crops and**
1040 **Products**, v. 177, p. 114484, 2022.
1041
- 1042 SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; SARAIVA, M.V.A.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R.
1043 Influence of oxygen tension in oocyte maturation and in vitro culture of follicles and embryos.
1044 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 233-242, 2010.
1045
- 1046 SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; LOPES, C.A.P.; FIGUEIREDO, J.R. The
1047 role of antioxidants in *in vitro* culture of Ovarian cells. **Revista Brasileira Reprodução**
1048 **Animal**, v. 35, n. 3, p. 315-326, 2011.
1049
- 1050 SILVA, O.A.; ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; LOURENÇO, N.V.; COSTA, J.P.;
1051 FREITAS, R.M. Avaliação dos efeitos antioxidantes in vitro do alfa-terpineol. In: 51º
1052 Congresso Brasileiro de Química – São Luís – MA, 2011, Disponível em:
1053 <<https://www.abq.org.br/cbq/2011/trabalhos/7/7-567-11188.htm> 2011>.
1054
- 1055 SILVA, S.B; BORGES, S.; RAMOS, O.L.; PINTADO, M.; SARMENTO, B. The progress of
1056 essential oils as potential therapeutic agents: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v.
1057 32, n. 4, p. 279-295, 2020.
1058
- 1059 SINGH, B.; SINGH, J.P.; KAUR, A.; YADAV, M.P. Insights into the chemical composition and
1060 bioactivities of citrus peel essential oils. **Food Research International**, v. 143, p. 110231,
1061 2021.
- 1062 SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M.T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in
1063 vitro embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 342-350, 2020.

- 1064
1065 SPINACI, M.; BUCCI, D.; MUCCILLI, V.; CARDULLO, N.; NEROZZI, C.; GALEATI, G. A
1066 polyphenol-rich extract from an oenological oak-derived tannin influences *in vitro* maturation
1067 of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 129, p. 82-89, 2019.
1068
- 1069 STAGOS, D. Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p.
1070 19, 2019.
1071
- 1072 TAO, Y.; XIA, G.; BO, S.; ZHOU, B.; ZHANG, M.; WANG, F. Nitric oxide exerts different
1073 functions on porcine oocytes cultured in different models, which is affected by beta-
1074 mercaptoethanol. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 17, n. 3, p. 317-324,
1075 2004.
1076
- 1077 TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, T. Protection of
1078 porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role
1079 of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology of Reproduction**, v. 71, n.
1080 4, p. 1150-1157, 2004.
1081
- 1082 TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic
1083 cell death caused by oxidative stress during. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 805-810,
1084 2000.
1085
- 1086 TEPLITZ, G.M.; SHI, M.; SIRARD, M.A.; LOMBARDO, D.M. Coculture of porcine luteal
1087 cells during *in vitro* porcine oocyte maturation affects blastocyst gene expression and
1088 developmental potential. **Theriogenology**, v. 166, p. 124-134, 2021.
1089
- 1090 TETELTITLA, M.; DUCOLOMB, Y.; SOUZA, V.; DOMÍNGUEZ, A.; RODRÍGUEZ-
1091 MERCADO, J.; FLORES, D.; BONILLA, E.; CASAS, E.; ALTAMIRANO, M.; LÓPEZ, A.;
1092 BAHENA, I.; GUTIERREZ, C.; CASILLAS, F.; BETANCOURT, M. Effects of
1093 perfluorooctanoic acid in oxidative stress generation, DNA damage in *cumulus* cells, and its
1094 impact on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Environmental Toxicology**, v. 37, n. 6, p.
1095 1394-1403, 2022.
1096

- 1097 TORNER, H.; BRÜSSOW, K. P.; ALM, H.; RATKY, J.; PÖHLAND, R.; TUCHSCHERER,
1098 A.; KANITZ, W. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and
1099 apoptosis in surrounding *cumulus* cells depends on the stage of pre-ovulatory
1100 maturation. **Theriogenology**, v. 61, n. 9, p. 1675-1689, 2004.
- 1101
- 1102 TORRES-OSORIO, V.; URREGO, R.; ECHEVERRI-ZULUAGA, J. J.; LÓPEZ-HERRERA,
1103 A. Oxidative stress and antioxidant use during *in vitro* mammal embryo production. Review.
1104 **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 10, n. 2, p. 433-459, 2019.
- 1105
- 1106 TOSCANO-GARIBAY, J.D.; ARRIAGA-ALBA, M.; SÁNCHEZ-NAVARRETE, J.;
1107 MENDOZA-GARCÍA, M.; FLORES-ESTRADA, J.J.; MORENO-EUTIMIO, M. A.;
1108 ESPINOSA-AGUIRRE, J.J.; GONZÁLEZ-ÁVILA, M.; RUIZ-PÉREZ, N.J. Antimutagenic
1109 and antioxidant activity of the essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia*. **Scientific**
1110 **Reports**, v. 7, n. 1, p. 11479, 2017.
- 1111
- 1112 VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in
1113 developmental competence. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 797-813, 2011.
- 1114
- 1115 WANG, L.Y.; WANG, D.H.; ZOU, X.Y.; XU, C.M. Funções mitocondriais em oócitos e
1116 embriões pré-implantação. **Jornal da Universidade de Zhejiang Science B**, v. 10, n. 7, pág.
1117 483-492, 2009.
- 1118
- 1119 WANG, W.; YANG, H.; JOHNSON, D.; GENSLER, C.; DECKER, E.; ZHANG, G. Chemistry
1120 and biology of ω -3 PUFA peroxidation-derived compounds. **Prostaglandins & Other Lipid**
1121 **Mediators**, v. 132, p. 84-91, 2017.
- 1122
- 1123 WANG, X.; ZHU, X.; LIANG, X.; XU, H.; LIAO, Y.; LU, K.; LU, S. Effects of resveratrol on
1124 *in vitro* maturation of porcine oocytes and subsequent early embryonic development following
1125 somatic cell nuclear transfer. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 9, p. 1195-1205,
1126 2019.
- 1127
- 1128 WHITAKER, B.D.; CASEY, S.J.; TAUPIER, R. The effects of N-acetyl-L-cysteine
1129 supplementation on *in vitro* porcine oocyte maturation and subsequent fertilisation and

- 1130 embryonic development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 8, p. 1048-1054,
1131 2012.
- 1132
- 1133 WHITAKER, B.D.; KNIGHT, J. W. Mechanisms of oxidative stress in porcine oocytes and the
1134 role of antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 6, p. 694-702, 2008.
- 1135
- 1136 WONGSRIKEAO, P.; KANESHIGE, Y.; OOKI, R.; TANIGUCHI, M.; AGUNG, B.; NIL, M.;
1137 OTOI, T. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and
1138 development of porcine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 2, p. 166-170,
1139 2005.
- 1140
- 1141 WU, C.; ZHANG, D., ZHANG, S.; SUN, L.; LIU, Y.; DAI, J. Effect of *Rhodiola sachalinensis*
1142 aqueous extract on *in vitro* maturation of porcine oocytes and subsequent *in vitro* embryonic
1143 development. **Cellular Reprogramming**, v. 22, n. 6, p. 277-281, 2020.
- 1144
- 1145 XIANG, D.C.; JIA, B.Y.; FU, X.W.; GUO, J. X.; HONG, Q.H; QUAN, G.B.; WU, G.Q. Role
1146 of astaxanthin as an efficient antioxidant on the *in vitro* maturation and vitrification of porcine
1147 oocytes. **Theriogenology**, v. 167, p. 13-23, 2021.
- 1148
- 1149 YANG, J.; LEE, S. Y.; JANG, S. K.; KIM, K. J.; PARK, M. J. Inhibition of melanogenesis by
1150 essential oils from the citrus cultivars peels. **International Journal of Molecular Sciences**, v.
1151 24, n. 4, p. 4207, 2023.
- 1152
- 1153 YAO, X.; JIANG, H.; NANXU, Y., PIAO, X.; GAO, Q.; KIM, N.H. Kaempferol attenuates
1154 mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by H₂O₂ during porcine embryonic
1155 development. **Theriogenology**, v. 135, p. 174-180, 2019.
- 1156
- 1157 YIN, Z.; SUN, J.-T.; CUI, H.-D.; JIANG, C. Q.; ZHANG, Y.-T.; LEE, S.; LIU, Z. H.; JIN, J.X.
1158 Tannin supplementation improves oocyte cytoplasmic maturation and subsequent embryo
1159 development in pigs. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1594, 2021.
- 1160
- 1161 YOU, J.; KIM, J.; LIM, J.; LEE, E. Anthocyanin stimulates *in vitro* development of cloned pig
1162 embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species.
1163 **Theriogenology**, v. 74, n. 5, p. 777-785, 2010.

- 1164 ZABIHI, A.; SHABANKAREH, H.K.; HAJARIAN, H.; FOROUTANIFAR, S. Resveratrol
1165 addition to *in vitro* maturation and *in vitro* culture media enhances developmental competence
1166 of sheep embryos. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 68, p. 25-31, 2019.
- 1167
- 1168 ZENG, Y.; SHINADA, K.; HANO, K.; SUI, L.; YANG, T.; LI, X.; HIMAKI, T. Effects of tris
1169 (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride treatment on porcine oocyte *in vitro* maturation and
1170 subsequent *in vitro* fertilized embryo developmental capacity. **Theriogenology**, v. 162, p. 32-
1171 41, 2021.
- 1172
- 1173 ZHANG, Y.; LI, Q.; LI, W.; YAN, K.; LIU, Y.; XU, H.; JIAN, M.; LU, Y.; LIANG, X.;
1174 SHANG, J.; YANG, X. 2-Mercaptoethanol promotes porcine oocyte maturation *in vitro* by
1175 maintaining autophagy homeostasis. **Theriogenology**, v. 186, p. 155-167, 2022.
- 1176
- 1177 ZHOU, C.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; LIU, X.; SUN, Y.; XIONG, B. Glutathione alleviates the
1178 cadmium exposure-caused porcine oocyte meiotic defects via eliminating the excessive ROS.
1179 **Environmental Pollution**, v. 255, p. 113194, 2019.